

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

GRENOBLE I

UFR BIOLOGIE

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE 1

DISCIPLINE : Biologie Structurale et Nanobiologies

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT PAR

Georges Tabarani

04 Septembre 2008

DC-SIGN, un récepteur détourné par de nombreux pathogènes:
caractérisation biochimique, structurale et développement
d'inhibiteurs.

Composition du Jury

Président
Rapporteurs

Examineur
Directeur de thèse

M. Serge Perez
M. Fernando Arenzana-Seisdedos
Mme Nushin Aghajari
M. Javier Rojo
M. Franck Fieschi

Remerciement :

Je tiens tout d'abord à remercier Eva Pebay-Peyroula pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Un merci particulier à Franck pour m'avoir présenter une charmante demoiselle à 4 mains qui adore accrocher, par un mécanisme d'avidité, tous « les hommes étrangers avec un humour très sucrés ». Pour ceux qui ont du mal à s'accrocher à DC-SIGN, croyez- moi elle est capable de s'accrocher à vous !!! ...

Je remercie Mme Nushin Aghajari, Messieurs Fernando Arenzana-Seisdedos, Javier Rojo et Serge Perez pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour le temps que vous y avez consacré.

Je remercie également Pierre-Jean pour sa relecture très attentive de mon manuscrit à la recherche de mes fautes de français.

Je remercie nos collaborateurs, les deux groupes d'Anna Bernardi et de Javier Rojo pour la grande confiance et pour l'amitié qu'ils nous ont accordé tout le long de cette thèse.

Un énorme merci à Dominique Durand et Patrice Vachette, Hugues Lortat-Jacob, Christine Ebel, Eric Girard pour leurs interventions ponctuels et décisives durant ma thèse.

Au niveau humain, je remercie Antoine, Carmen, Iulia, Céline & Céline pour tout le côté Fun et humain qu'ils m'ont partagé au Labo.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien permanent et inconditionnel

Je tiens à remercier ma femme Isa pour tout l'amour qu'elle me donne et tout le bonheur qu'elle me fait vivre au quotidien depuis plus que 5 ans et demi déjà...

Je dédicace ce travail à mon peuple, au pays des cèdres de dieux et à toute personne qui sacrifie sa présence au sein de sa famille pour atteindre un rêve...

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag	Antigène
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate
BCR	B- Cell Receptor
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
Ca ²⁺	Ion Calcium bivalent
CCR	Récepteur de chimiokine
CD	Circular Dichroism
CK	Cytokine
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule présentant l'antigène
CpG-ADN	Cytosine-guanine dinucléotide ADN
CTLD	C-type Lectin-Like Domain
CXCR	Recepteur de chimiokine
DC	Dendritic Cell
DC-LAMP	DC-lysosome-associated membrane glycoprotein
DC-SIGN	Dendritic Cell-specific ICAM3-Grabbing Non-integrin
DO	Densité Optique
DPTA	Diethylenetriaminepentaacetic
E.coli	Escherichia coli
EDC	Ethyl-N-(3-Diethylaminopropyl)Carbodiimide
EDTA	Ethylène-diamine-tétraacétique
ERK	Extracellular Signal-Regulated kinases
Fuc	Fucose
GlcNac	N-Acétyl glucosamine
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HCl	Acide Chloridrique
HD	High density
HIP-PAP	Hépatocarcinome Intestin Pancréas-Protéine associée à la Pancréatite
His	Histidine
HLA	Human Leukocyte Antigen
IPC	Interferon- α producing cells
IFN- α	Interféron alpha
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule
IDC	Interdigitating DC
IL	Interleukine
IPC	IFN-alpha producing cell
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activated motif
LAMs	Lipo-Arabino-Mannane

LB	Luria Bertani
LC	Langerhans Cells
LD	Low density
LPS	Lipopolysaccharide bactérien
LT	Lymphocyte T
Man	Mannose
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MASP	Mannose-binding protein-associated serine protease
MBP	Mannose Binding Protein
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MIP	Macrophage inflammatory protein
Mo-DC	Cellules dendritiques dérivées de monocytes
MR	Mannose receptor
MRA	Magnetic Resonance Angiography
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MVB	Multivesicular bodies
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIPC	Natural IFN- α Producing Cell
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction: réaction d'amplification en chaîne
pDC	plasmocytoid Dendritic cell
Pré-DC	Précurseur de cellules dendritiques
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RU	Résonance Unit
Rug	RU de greffe
SAXS	Small Angle X-Ray scattering
SP	Surfactant Protein
SPR	Surface Plasmon Resonance
TGF- β	Transforming growth factor
TCR	T-Cell Receptor
TLR	Toll-Like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Introduction

CHAPITRE 1 : Introduction à l'Immunité	3
1.1. Notions générales:	3
1.2. Système immunitaire et ses composantes:	3
1.2.1. Immunité non-spécifique:	4
1.2.2. Immunité spécifique:	6
CHAPITRE 2 : Les cellules dendritiques	11
2.1. Introduction:	11
2.2. Présentations des cellules dendritiques chez l'homme:	12
2.2.1. Les DCs plasmocytoïdes:	12
2.2.2. Les DCs myéloïdes:	14
2.2.2.1. Stade de maturation et localisation anatomique :	14
2.2.2.2. Ontogénie des cellules dendritiques myéloïdes:	16
2.2.2.3. Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques myéloïdes et rôle physiologique:	19
2.2.2.4. Cellules dendritiques myéloïdes et récepteurs de chimiokines : recrutement des cellules dendritiques:	20
2.2.2.5. Capture des antigènes par les cellules dendritiques myéloïdes et « Toll-like Receptor »:	22
2.2.2.6. Voie de signalisation des cellules dendritiques myéloïdes:	24
2.3. Orientation de la réponse immune:	25
CHAPITRE 3 : Les Lectines de type C	27
3.1. Généralités sur les lectines:	27
3.2. Généralité sur les lectines type C:	29
3.3. Les différentes lectines de type C identifiés:	30
3.3.1. La famille des collectines:	30
3.3.1.1. L'analyse structural des collectines :	34
3.3.1.2. Domaine de reconnaissance des sucres par les MBPs:	37
3.3.1.3. Modalité de reconnaissance des sucres par les autres lectines de type C:	41
3.3.2. Le récepteur du mannose (MR):	41
3.3.2.1. L'organisation spatiale:	43
3.3.2.2. L'information structurale:	44

3.3.3. La famille des sélectines :	47
3.3.3.1. Sélectines dans le trafic des lymphocytes:	47
3.3.3.2. L'organisation des sélectines:	48
3.3.3.3. Les ligands des sélectines :	48
3.3.3.4. L'analyse structure –fonction des sélectines:	49
3.3.4. La famille de DC-SIGN:	51
3.4. La multimérisation des lectines types C:	51
3.5. La spécificité des lectines via les séquences glycosidique des ligands:	52
3.6. La prise en charges des antigènes par les lectines types C:	53

CHAPITRE 4 : La lectine DC-SIGN 55

4.1. Introduction:	55
4.2. Structure de DC-SIGN:	56
4.3. Localisation de DC-SIGN:	59
4.4. Les fonctions de DC-SIGN:	60
4.4.1. Rôle de DC-SIGN dans la migration des cellules dendritiques:	60
4.4.2. Rôle de DC-SIGN dans la transduction du signal intracellulaire:	60
4.4.3. Rôle de DC-SIGN dans la synapse immunologique:	61
4.4.4. Rôle de DC-SIGN dans l'induction d'une réponse immunitaire:	62
4.5. Rôle de DC-SIGN dans les pathologies:	62
4.5.1. DC-SIGN et la tuberculose:	63
4.5.2. DC-SIGN et les tumeurs:	64
4.5.3. DC-SIGN et le VIH:	64

CHAPITRE 5: Développements d'inhibiteurs 67

5.1. Introduction:	67
5.2. Les Glycodendrimères:	67
5.2.1. La synthèse:	68
5.2.2. La structure moléculaire :	69
5.2.3. Propriétés:	71
5.2.4. Application:	73
5.2.4.1. Outils de diagnostics:	73
5.2.4.2. Imagerie médicale:	74
5.2.4.3. Stratégie anti-infectieuse:	75
5.2.4.4. Catalyseurs chimiques:	76
5.3. Les analogues osidiques non hydrolysables: les « glycomimics »	77
5.3.1. Le mécanisme d'action des glycosidases:	78

5.3.2. Deux approches réalisés pour la conception des « glycomimics »:	78
--	----

MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes utilisées:	85
2. Biologie moléculaire:	85
2.3. Construction du plasmide DC-SIGN SNeck (mutagenèse dirigée):	86
2.4. Digestion du plasmide par les enzymes de restriction:	87
2.5. Ligation des plasmides:	87
3. Biochimie:	88
3.1. Croissance cellulaire et surexpression de la protéine d'intérêt:	88
3.2. Préparation d'extrait brut:	88
3.3. Étapes de purification:	88
3.3.1. À partir de corps d'inclusion:	88
3.3.1.1. Renaturation des protéines:	88
3.3.1.1.1. Isolement et lavage des corps d'inclusion:	88
3.3.1.1.2. Solubilisation de corps d'inclusion:	88
3.3.1.1.3. Renaturation:	89
3.3.1.2. Purification des protéines recombinantes sur colonnes:	89
3.3.1.2.1. Chromatographie d'affinité sur colonne Mannan-Agarose:	89
3.3.1.2.2. Chromatographie par exclusion de taille:	89
3.3.2. À partir d'extraits solubles:	90
3.3.2.1. Lyse des cellules:	90
3.3.2.2. Purification des protéines recombinantes sur colonne de Strep-Tactine:	90
3.3.2.3. Coupure de l'étiquette Strep-tag II:	91
3.3.2.4. Chromatographie d'exclusion de taille:	91
4. Analyse Biophysiques:	91
4.1. Séquençage N-terminal:	91
4.2. Le protocole utilisé pour le séquençage N-terminal:	92
4.3. Spectrométrie de masse:	92
4.3.1. Principe:	92
4.3.2. Les deux types de spectrométrie de masse:	93
4.3.2.1. Ionisation MALDI ((Matrix –Assisted Laser Desorption-Ionisation):	93
4.3.2.2. Ionisation par electrospray:	93
5. Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD):	94
5.1. Principe:	94
5.2. Acquisition des données:	95

6. Cristallogenèse:	96
6.1. Principe:	96
6.2. Mise en œuvre:	97
7. Technologie BIAcore (SPR):	98
7.1. Généralité:	98
7.2. Le système de mesures:	98
7.3. Principe physique:	99
7.4. L'application du principe de la SPR pour l'étude des interactions biomoléculaires:	99
7.5. La technique d'immobilisation utilisée pour les pistes orientées et non orientées:	101
7.6. Mise en œuvre:	102
8. Ultracentrifugation analytique (AUC):	102
8.1. Instrumentation:	102
8.2. La détection:	103
8.3. Le type d'études:	104
8.4. La théorie physique:	105
8.4.1. Le calcul du coefficient de sédimentation (pour un soluté idéal):	105
8.4.2. La normalisation du coefficient de sédimentation:	106
8.4.3. Relations entre f , RH et D et leur modélisation:	106
8.4.4. Équation de Lamm :	106
8.4.5. Vitesse de sédimentation: le transport est dominé par la sédimentation	107
8.4.6. Position du front:	107
8.5. Analyse du profil de sédimentation:	107
8.6. Mise en oeuvre:	108
9. La technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS):	108
9.1. Introduction de la technique SAXS:	109
9.2. La reconstitution 3D	109
9.3. Détermination de la forme moléculaire <i>ab initio</i> :	110
9.4. L'appareillage et les conditions expérimentales:	111
9.5. Conditions expérimentales et traitements réalisés:	112

BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE

RESULTATS

CHAPITRE 1: Développement des outils protéiques 121

1. Constructions disponibles DC-SIGN EC et CRD :	121
1.1. Surexpression et renaturation du DC-SIGN EC et DC-SIGN CRD:	121
1.2. Purification des protéines:	122
1.2.1. Chromatographie d'affinité: Mannan-Agarose:	122
1.2.2. Chromatographie d'exclusion:	124
1.3. Test de fonctionnalité:	125
2. Nouvelles constructions génétiques réalisées:	126
2.1. Construction du plasmide DC-SIGN SEC:	126
2.2. Expression de DC-SIGN SEC:	127
2.3. Construction du plasmide exprimant DC-SIGN SNeck:	128
2.4. Purification de DC-SIGN SNeck:	129
2.4.1. Surexpression de DC-SIGN SNeck:	129
2.4.2. Lyse de cellules:	129
2.4.3. Coupure purification des protéines recombinantes sur colonnes:	130
2.4.3.1. Chromatographie d'affinité:	130
2.4.3.2. Coupure du Strep-tag II:	131
2.4.3.3. Chromatographie d'exclusion:	131

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules ligands potentiels pour DC-SIGN 137

1. Introduction:	137
2. Organisation du travail et objectif:	141
2.1. Validation du concept d'interaction et d'inhibition par présentation multivalente d'un ligand:	141
2.2. Optimisation de la fonctionnalisation et de la nature du ligand osidique :	145
2.2.1. Modification de l'emplacement du branchement sur le cycle osidique :	145
2.2.2. Caractérisation de nouveaux ligands type glycomimics:	149
2.2.2.1. Le pseudo- mannose(α 1-2)mannose: le1,2-mannobioside	149
2.2.2.1.1. Etudes avec le 1,2-Mannobioside monovalent:	149
2.2.2.1.2. Etudes avec le 1,2-Mannobioside multivalent:	153
2.2.2.2. Le Glycomimic basé sur la structure de Lewis-X:	154
2.2.2.3. Détermination des zones du ligand et de ces conformations impliquées dans l'interaction avec DC-SIGN:	159

CHAPITRE 3 : Caractérisation biochimique et structurale du domaine extracellulaire de DC-SIGN _____ 163

4.1. Le Contexte du travail : _____	163
4.1.1.DC-SIGN dans le contexte cellulaire: _____	163
4.1.2. L'implication du pH dans la reconnaissance des pathogènes par DC-SIGN: _____	165
4.1.3. DC-SIGN ECD et le développement des inhibiteurs: _____	165
4.2. La région Neck et les interactions type coiled-coil: _____	166
4.2.1. Les interactions type coiled –coil: _____	166
4.2.2. La région Neck de DC-SIGN: _____	169
4.2.2.1. Information sur l'organisation de la région Neck de DC-SIGN: _____	169
4.2.2.2. Construction protéique de la région Neck de DC-SIGN : importante, dure... et ignorée. _____	171

CHAPITRE 4 : Mise au point d'une piste orientée _____ 177

1. Introduction sur les pistes orientées et non orientées: _____	177
2. Les Strep-tags et la Streptavidine/Strep-Tactine: _____	179
3. La réversibilité de l'interaction de Strep-tag II/Strep-Tactine: _____	180
4. Mise au point des pistes orientées Strep-Tactine/ Strep-tag II: _____	181
4.1. Immobilisation de la Strep-Tactine: _____	181
4.2. Phase de capture: _____	182
4.3. Analyse de la stabilité: _____	183
4.4. Analyse de la fonctionnalité et de l'interaction réversible des sucres avec les pistes SCRD et SEC: _____	183
4.5. Régénération des pistes Strep-Tactine pour une nouvelle «phase de capture»: _____	184
4.6. Etude de la reproductibilité et de la spécificité de l'interaction entre le Strep-tag II et la piste Strep-Tactine: _____	185
4.7. Comparaison entre la piste orientée DC-SIGN SEC et non orientée DC-SIGN EC: _____	186
4.8. Comparaison entre la présentation du ligand à DC-SIGN EC en solution ou sur une piste orientée: _____	192

CHAPITRE 5 : Essai Cristallogénèse _____ 199

1. Essais de cristallogénèses de DC-SIGN Neck: _____	199
2. Essais de cristallogénèse de DC-SIGN SNeck: _____	201

Conclusion _____ 207

Bibliographie _____ 215

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Introduction à l'Immunité

1.1. Notions générales:

Le terme Immunologie est dérivé du latin *Immunis*, signifiant déchargé de fardeau où le mot fardeau signifiait un impôt ou l'astreinte à une loi et par extension à une maladie. Le terme d'immunité se réfère avant tout à la résistance à un agent pathogène générateur de maladie. La fonction première du système immunitaire est l'intégrité du Soi et sa mise en jeu vise donc à éliminer ou neutraliser tout élément reconnu comme étranger au Soi et potentiellement pathogène. Il est probable que le développement du système immunitaire des vertébrés supérieurs ait été induit à la fois dans un but de défense contre les micro-organismes de leur environnement et de maintenance de l'intégrité de leurs tissus, c'est-à-dire la surveillance à l'égard de cellules tumorales, sénescents ou abîmées. L'allongement considérable de la durée de vie observée dans les sociétés développées depuis un siècle grâce à un contrôle plus efficace des maladies infectieuses (hygiène, vaccins, antibiotiques) indique que le système immunitaire est loin d'être infaillible dans ses objectifs.

Afin de pouvoir se défendre contre les corps « étrangers », les différentes composantes du système immunitaire devront reconnaître des structures qui sont dénommées antigènes. Ces derniers peuvent être de nature très diverse, protéique, glucidique ou glyco-lipidique. Il n'existe pas d'autre façon de définir un antigène que par le récepteur immun qui le reconnaît. C'est le système immunitaire qui définit opérationnellement son environnement quasi infini de ligands.

1.2. Système immunitaire et ses composantes:

Le système immunitaire protège l'organisme contre les infections. Cette tâche est accomplie grâce à l'action concertée de différents types cellulaires employant différents mécanismes. Face à un corps étranger l'organisme déploie deux lignes de défense; une réponse non-spécifique ou innée, assurée majoritairement par des cellules phagocytaires telles les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, et une défense spécifique ou acquise, faisant intervenir les lymphocytes B et T. La prochaine section décrira sommairement ces deux types de réponse immune (figure.1.1).

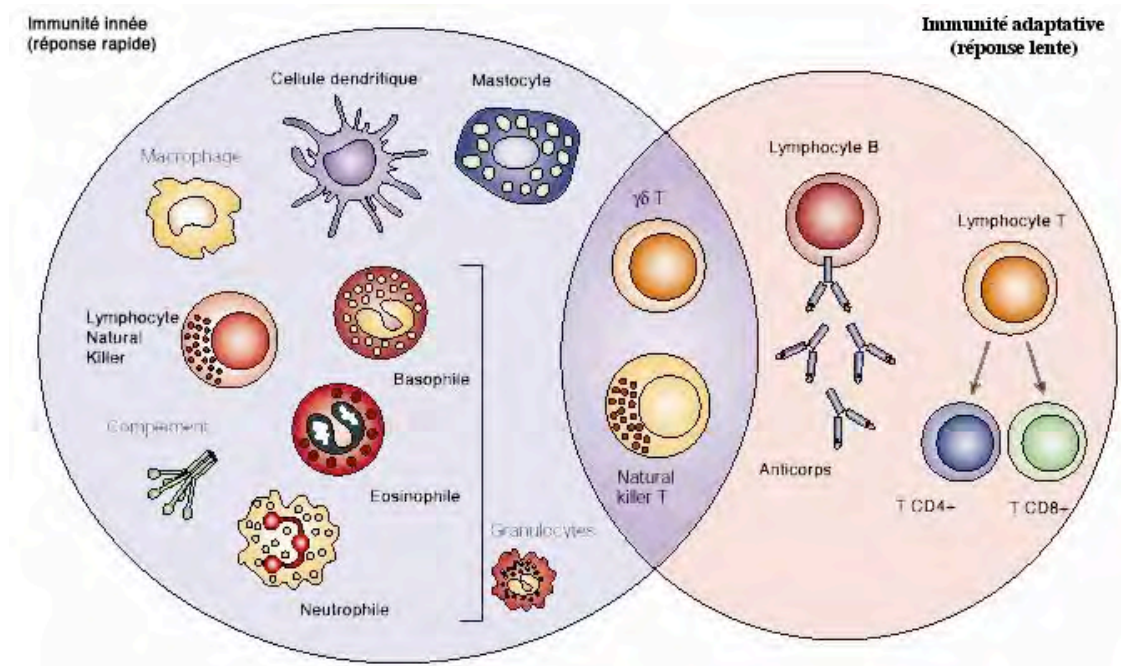


Figure.1.1: Présentation des différentes composantes du système immunitaire appartenant à l'immunité innée (dans le cercle bleu) et à l'immunité acquise (dans le cercle rose). (Boutonat, 2008).

1.2.1. Immunité non-spécifique:

L'immunité innée utilise des mécanismes qui ne sont pas spécifiques à un pathogène particulier. Elle est la première ligne de défense durant la période critique suivant l'exposition de l'hôte à un pathogène.

Les cellules de l'immunité innée détectent des signaux provenant de pathogènes et alertent le système de la présence d'envahisseurs infectieux et potentiellement dangereux. Cette immunité met en jeu une famille de récepteurs particuliers présents à la surface des cellules de l'immunité non-spécifique, qui reconnaissent des patrons conservés de pathogènes. Suite à une telle reconnaissance, une réponse inflammatoire et antimicrobienne est déclenchée par les cellules de l'immunité innée. La reconnaissance de produits microbiens par ces récepteurs, et plus particulièrement les Toll-Like Receptors (TLRs) exprimés sur les cellules dendritiques, conduit à une maturation de ces cellules dendritiques et, suite au relargage de cytokines inflammatoires et à l'expression de molécules de costimulation, elles envoient des signaux aux cellules T CD4+, les entraînant vers une différenciation adaptée selon la nature de la menace microbienne (Marieb, 2005).

Les cellules phagocytaires jouent un rôle important dans plusieurs aspects de cette immunité. Ces cellules spécialisées, tels les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, ont la capacité de phagocyter et détruire le pathogène rencontré. Notamment, les neutrophiles sont équipés d'un arsenal de mécanismes effecteurs bactéricides très puissants incluant leur habileté à adhérer, à phagocyter et à dégrader le microorganisme phagocyté via la production d'espèces réactives d'oxygènes et la libération d'enzymes et de protéines bactéricides, stockés dans diverses populations de granules, dans le phagolysosome (Marieb, 2005). Chez les macrophages, les particules phagocytées sont également dégradées par des enzymes lysosomiaux (figure.1.2).

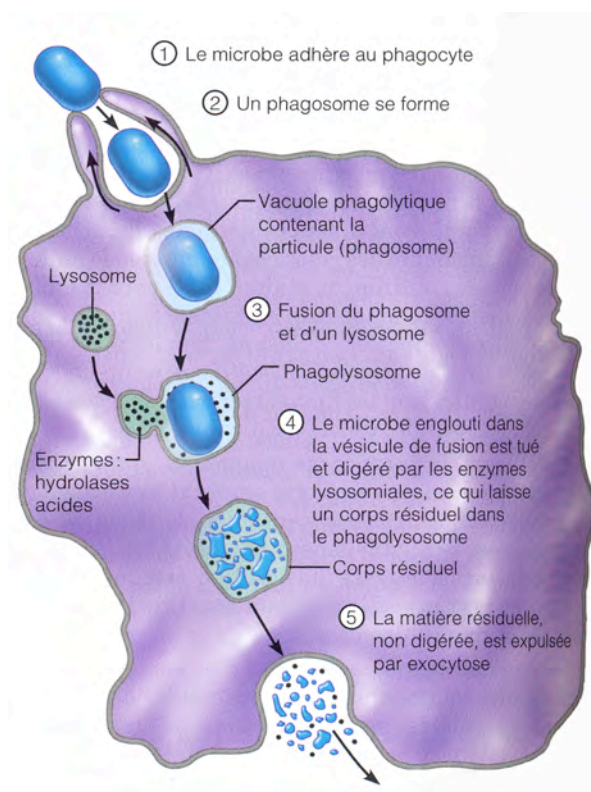


Figure.1.2: Étapes de la phagocytose. Ici est présenté un microbe (en bleu) internalisé et dégradé par un macrophage (en violet) (Marieb, 2005).

Les macrophages (annexe.1) produisent également des cytokines qui recrutent d'autres cellules inflammatoires, spécialement le neutrophile, et qui sont responsables de plusieurs des effets systémiques de l'inflammation comme la fièvre. Les phagocytes sont attirés sur les lieux d'une réaction inflammatoire par chimiotaxie où ils procèdent à la phagocytose des microorganismes pathogènes présents ainsi que des débris cellulaires.

L'immunité innée et l'immunité acquise ne sont pas indépendantes l'une de l'autre, en effet elles agissent en collaboration. Ainsi les pathogènes détectés par les TLRs de la cellule dendritique commandent la maturation des lymphocytes T CD4⁺ et initient la réponse immune spécifique. D'autre part, les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes (elles expriment des portions de l'antigène phagocyté à leur surface en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II) essentielles à l'activation des lymphocytes T auxiliaires. De plus, dans certaines conditions, les lymphocytes T activés peuvent sécréter des cytokines qui activent le macrophage et le rendent plus efficace dans la phagocytose. Enfin, après la génération d'anticorps par les cellules B, les antigènes étrangers sont recouverts, ou opsonisés, par les molécules d'anticorps et les protéines du complément. Les macrophages qui expriment les récepteurs de surface pour les anticorps et certaines protéines du complément lient et phagocytent ces particules opsonisées avec beaucoup plus d'avidité que celles qui ne le sont pas. Ainsi les macrophages participent à l'élimination des antigènes étrangers par l'immunité humorale (voir annexe.7).

1.2.2. Immunité spécifique:

L'immunité acquise est hautement spécifique et a la propriété remarquable de conserver une mémoire. Typiquement, la réponse spécifique à un antigène survient entre cinq à six jours après l'exposition initiale à cet antigène. Par contre, une deuxième exposition à ce même antigène dans le futur engendrera une réponse mémoire survenant plus rapidement, qui sera plus forte et souvent plus efficace pour neutraliser et éliminer le pathogène. Les principaux acteurs de l'immunité acquise sont les lymphocytes et les anticorps et d'autres molécules qu'ils produisent.

Les lymphocytes B effectuent leur maturation dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils en ressortent, chaque lymphocyte B exprime un récepteur d'antigène unique à sa surface (B cell receptor ou BCR). Le BCR est une molécule d'anticorps liée à la membrane. Lorsqu'une cellule B naïve, qui n'a jamais rencontré d'antigène, rencontre pour la première fois l'antigène pour lequel son récepteur est spécifique, la liaison BCR-antigène initie la division rapide de la cellule. Sa progéniture se différencie en cellules B mémoires et cellules B effectrices, également appelées plasmocytes (figure.1.3).

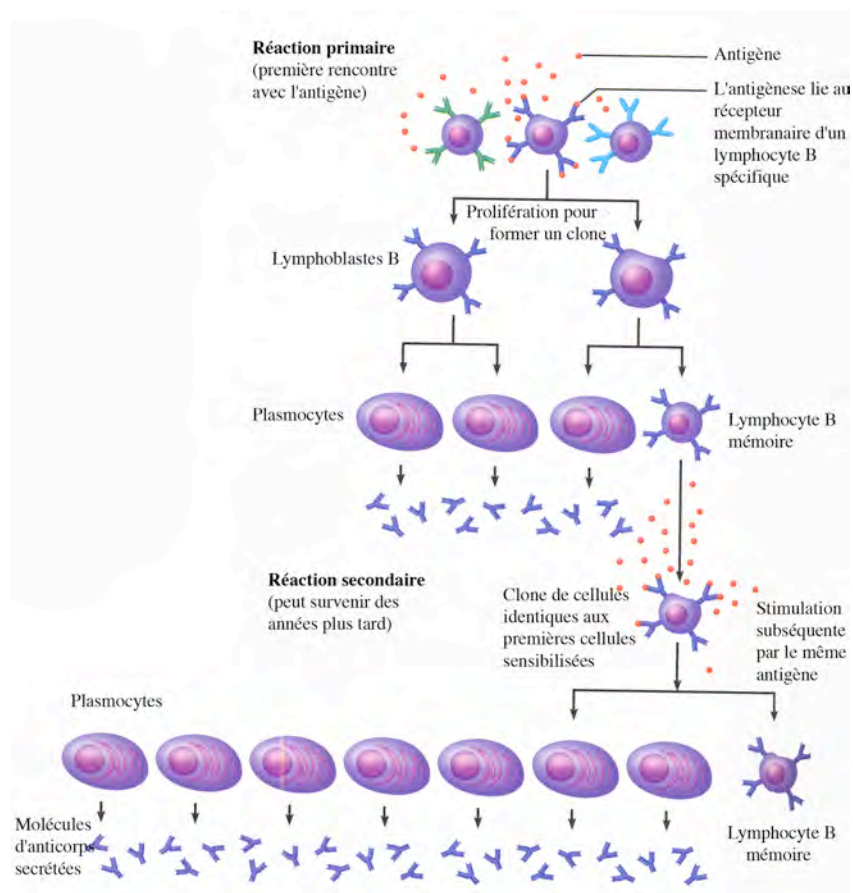


Figure.1.3 : Sélection clonale d'un lymphocyte B. La rencontre initiale entre un lymphocyte B et l'antigène stimule la réaction primaire, au cours de laquelle la prolifération rapide du lymphocyte entraîne la formation d'un clone de cellules identiques. La plupart de ces cellules se transforment en plasmocytes, producteurs d'anticorps. Les cellules qui ne se différencient pas en plasmocytes deviennent des cellules mémoire, qui sont déjà sensibilisées pour répondre à des expositions subséquentes au même antigène. Si une telle rencontre survient, les cellules mémoire produisent rapidement d'autres cellules mémoire et un grand nombre de plasmocytes effecteurs ayant la même spécificité antigénique. Les réactions déclenchées par les cellules mémoire sont dites secondaires (Marieb, 2005).

Les cellules B mémoire ont une plus longue durée de vie que les cellules naïves et continuent à exprimer le même anticorps de surface (BCR) que la cellule naïve dont elles sont issues. Lors d'une exposition à l'antigène, les cellules B mémoires prolifèrent et se différencient en plasmocytes. Les cellules effectrices n'expriment plus d'anticorps de surface mais produisent l'anticorps sous une forme pouvant être sécrétée. Bien que ces cellules ne vivent que quelques jours, elles arrivent à sécréter d'énormes quantités d'anticorps durant cette période et ces anticorps sont les molécules effectrices principales de l'immunité humorale puisqu'elles lient l'antigène pour le neutraliser ou faciliter son élimination.

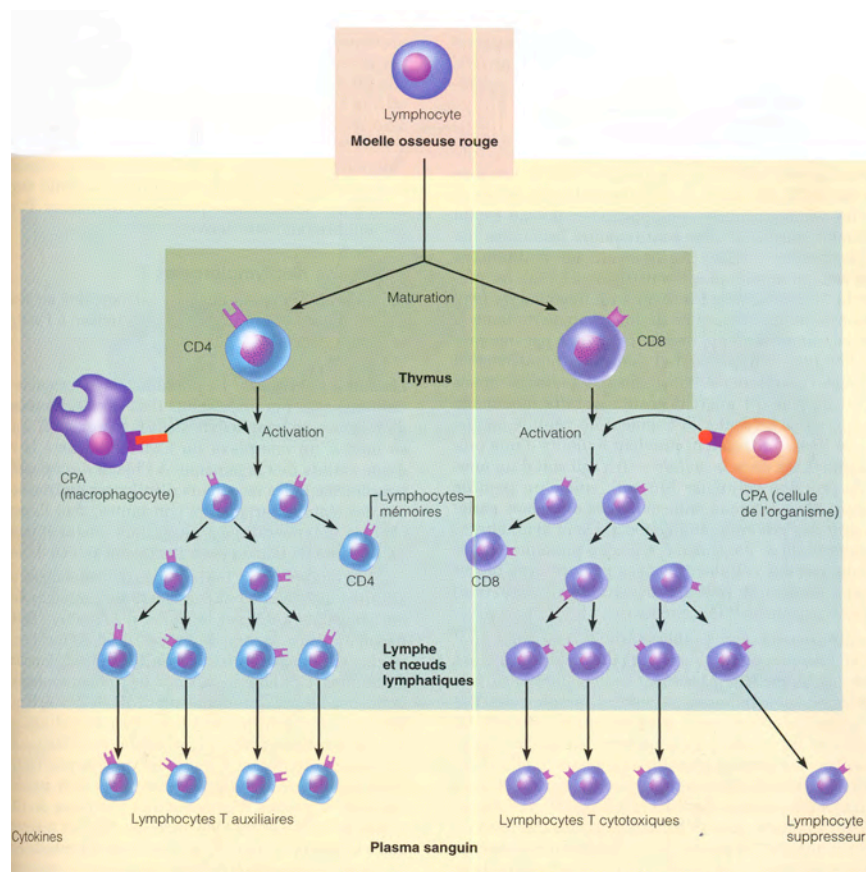


Figure.1.4 : Principaux types de lymphocytes T selon les glycoprotéines de différenciation (CD4, CD8) présentes à leur surface (Marieb, 2005).

Les lymphocytes T sont issus de précurseurs présents dans la moelle osseuse ayant migré dans le thymus où ils ont réalisé leur maturation (lymphocyte T référant à thymus-derived). Ces lymphocytes T matures sont subdivisés en populations ayant des fonctions distinctes, les mieux définies étant les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Ces populations expriment différentes protéines membranaires qui servent de marqueurs phénotypiques. C'est ainsi que la plupart des cellules T auxiliaires expriment une protéine de surface nommée CD4 alors que la majorité des cellules T cytotoxiques expriment le marqueur CD8. Des données plus récentes ont identifié une sous-population des cellules T CD4+, les cellules T régulatrices (Tregs), impliquée dans l'induction de la tolérance (Marieb, 2005). Ces cellules expriment souvent le marqueur CD25 mais pas invariablement. D'autres études seront requises pour bien définir leur phénotype et leur rôle (figure.1.4).

Les lymphocytes T initient l'immunité spécifique à médiation cellulaire et humorale en reconnaissant des portions d'antigènes protéiques (peptides) liés à des molécules du CMH à la

surface d'autres cellules (voir annexe.13). Il existe deux types de molécules du CMH, le CMH de classe I, exprimé par pratiquement toutes les cellules nucléées, et le CMH de classe II, dont l'expression est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes incluant les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (auxquelles un chapitre est consacré). Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) reconnaissent un peptide en association avec une molécule du CMH de classe II alors que les cellules T cytotoxiques reconnaissent un peptide complexé à une molécule du CMH de classe I. Les cellules T sont insensibles à ces mêmes antigènes qu'ils soient circulants ou solubles et pour cette raison la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T est dite restreinte par le CMH. Suivant l'activation par un antigène spécifique, les cellules T prolifèrent et se différencient en cellules T mémoires ou effectrices. Les cellules T activées sécrètent des cytokines et plusieurs de celles-ci agissent sur d'autres populations cellulaires impliquées dans la défense de l'hôte. Les cytokines sécrétées par le lymphocyte T auxiliaire (CD4+) activent la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B, activent les macrophages et causent l'inflammation. Pour sa part, l'activation du lymphocyte T cytotoxique (CD8+) mène à la lyse de la cellule lui ayant présenté l'antigène.

CHAPITRE 2 : Les cellules dendritiques

2.1. Introduction:

Les cellules dendritiques (DC) constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules interviennent à différents niveaux dans le système immunitaire incluant l'établissement de mécanismes de tolérance centrale dans le thymus, l'entretien de mécanismes de tolérance périphérique (voir annexe.11 et 12), l'initiation et la régulation des réponses immunes innée et adaptative. Ces fonctions diverses et parfois opposées sont accomplies par différentes sous-populations de DC qui se distinguent sur bases phénotypiques, morphologiques, fonctionnelles, ontogéniques et/ou anatomiques (Banchereau et *al.* 2000, Steinman et *al.* 2002, Banchereau et *al.* 2000). Les mécanismes précis et les médiateurs qui orientent les DCs vers le développement d'une réponse immune efficace ou vers l'induction de mécanismes de tolérance font l'objet de nombreux travaux et ne sont pas encore complètement élucidés.

Les mécanismes de défense contre les antigènes (Ag) étrangers sont basés sur la coexistence de deux systèmes et qui sont l'immunité innée non spécifique à l'Ag et la réponse immune adaptative spécifique de l'Ag. Les DCs constituent un lien entre ces 2 réponses par leur capacité à répondre rapidement à un pathogène et à stimuler les cellules de l'immunité innée sans reconnaissance spécifique puis, ensuite, à initier une réponse immune spécifique à cet antigène. Elles jouent donc un rôle clé dans la réponse immune grâce aux interactions qu'elles sont capables d'établir avec les principaux effecteurs de l'immunité innée et adaptative (lymphocytes T, B, cellules Nk) (Banchereau et *al.* 2000, Reid et *al.* 2000). Elles sont aussi uniques dans l'organisme par leur pouvoir à induire une réponse immune primaire : ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnels (CPA), c'est-à-dire qu'elles sont capables de présenter des Ags à des lymphocytes T naïfs permettant ensuite l'établissement d'une mémoire immunologique.

À toutes ces fonctions correspondent vraisemblablement différentes populations de DC qui se complètent (Banchereau et *al.* 2000). Cette hétérogénéité conditionnerait les différentes fonctions des DCs. Différentes théories tentent d'expliquer les facteurs qui déterminent la fonction du DC. Il est possible d'identifier quatre hypothèses : la première propose que la localisation anatomique des DCs conditionne leur fonction, la seconde et la plus répandue

s'appuie sur le stade de maturation des DCs (les DCs immatures ou semi-matures, selon certains auteurs, seraient tolérogènes et les DCs matures immunogènes), la troisième théorie attribue à l'origine ontogénique de ces cellules des fonctions différentes (DC1 myéloïdes et DC2 plasmocytoïdes), enfin la quatrième, défendue par Lanzavecchia (Lanzavecchia et *al.* 2001), met en avant la cinétique d'interaction de la DC et du lymphocyte T.

2.2. Présentations des cellules dendritiques chez l'homme:

Il existe deux grandes familles de DC chez l'homme : les DC myéloïdes les plus anciennement connues (qui avaient été nommés DC1 car il avait été montré qu'elles orientaient la réponse immune vers la production de cytokines (Ck) de type 1 (INF- γ et TNF- α principalement) et les DC plasmocytoïdes (nommées pDC ou DC2 car contrairement aux DC1, les premiers articles les concernant avaient montré qu'elles orientaient la réponse immune vers la production de ck de type2 (IL-4 et IL-5 de manière schématique), et pour lesquelles une origine lymphoïde est souvent évoquée dans la littérature (Banchereau et *al.* 2000, Ardavin et *al.* 1993, Res et *al.* 1996, Dalloul et *al.* 1999, Galy et *al.* 1995, Grouard et *al.* 1997, Strobl et *al.* 1998, Robinson et *al.* 1999, Res et *al.* 1999, Spits et *al.* 2000, Dzionek et *al.* 2000, Cella et *al.* 1999)

Bien que cette dichotomie en 2 voies ontogéniques différentes ne soit pas encore formellement établie, il n'en reste pas moins que chacun de ces types cellulaires possède des caractéristiques et des fonctions complémentaires dans l'organisme. Les DCs plasmocytaires (Banchereau et *al.* 2000) qui sort de mon cadre d'études seront décrites très brièvement, et d'une façon plus détaillée les DCs myéloïdes (Steinman et *al.* 2002) qui expriment à leur surface la protéine d'intérêt sur laquelle repose mon sujet de thèse.

2.2.1. Les DCs plasmocytoïdes:

Ces cellules particulières intriguent les anatomopathologistes depuis longtemps car elles ont une morphologie plasmocytoïde qui évoque une origine plasmocytaire mais ne possèdent pas d'immunoglobulines intracytoplasmiques. En 1958, Lennert les a décrites comme une population de cellules de taille moyenne ressemblant aux plasmocytes. Comme elles n'exprimaient pas leurs marqueurs de membrane, mais le marqueur de lignée T CD4 et qu'elles étaient abondantes dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, elles ont été nommées cellules T plasmocytoïdes (Lennert et *al.* 1958, Lennert et *al.* 1975).

Paradoxalement, ces cellules n'exprimaient pas les autres marqueurs caractéristiques « forts » de lignée T (comme les sous-unités du CD3 exprimées en surface des CD3 ϵ ou le T-Cell receptor (TCR) (Facchetti et *al.* 1998, Facchetti et *al.* 1986, Facchetti et *al.* 1991). La mise en évidence, plus tard, de l'expression de marqueurs assignés à la lignée monocyttaire comme le CD68 les ont fait renommer monocytes plasmocytoïdes (Facchetti et *al.* 1998, Facchetti et *al.* 1986, Facchetti et *al.* 1989). Suite à cette caractérisation, elles ont été décrites dans les ganglions normaux et réactionnels (Facchetti et *al.* 1991, Facchetti F et *al.* 1988), ainsi que dans différents tissus inflammatoires (métastases de cancer de sein (Facchetti et *al.* 1986).

En 1997, deux équipes ont montré que ces cellules avaient des propriétés fonctionnelles qui les rattachaient à la lignée dendritique et c'est ainsi que les DCs plasmocytoïdes ou pDC ont été caractérisées (Spits et *al.* 2000, Fitzgerald-Bocarsly et *al.* 1993).

Les virologistes, de leur côté, avaient décrit des cellules sanguines, qui exprimaient le CD4 et les molécules HLA de classe II (Human Leukocyte Antigen class II) et qui possédaient une très forte capacité de sécrétion d'IFN- α en réponse à une stimulation virale (Siegal et *al.* 1999). Ils l'avaient alors nommée la cellule naturelle productrice d'IFN- α (NIPC en anglo-saxon pour natural IFN- α producing cell).

En 1999, les groupes de Liu et Colonna ont montré parallèlement que les précurseurs des pDC avaient la capacité de forte production d'IFN- α en réponse à une stimulation virale et qu'elles correspondaient à la principale cellule sécrétrice d'IFN- α de l'organisme (IPC pour IFN- α producing cell) (Cella et *al.* 1999, Blom et *al.* 2000).

Les différents noms de ces cellules utilisés dans la littérature sont : cellules dendritiques plasmocytoïdes ou pDC, IPC, DC CD11c-, DC lymphoïdes. Initialement, elles ont été aussi nommées DC2 du fait de leur profil de sécrétion de cytokines (Grouard et *al.* 1997, Robinson et *al.* 1999) et leur capacité à orienter les lymphocytes T CD4+ naïfs à sécréter des CK de type 2.

Les pDC possèdent des caractéristiques qui leur sont propres : les cytokines nécessaires à leur développement, leur phénotype, leur réponse aux pathogènes les corrélant à une expression particulière de PRR (Pattern- Recognition Receptor), leur production de cytokines, leur capacité migratoire et leurs fonctions les différencient sur tous ces points des mDC. Depuis leur caractérisation, les pDC sont bien documentées comme présentes à différents stades de maturation dans les zones T des ganglions normaux, réactionnels ou pathologiques (Banchereau et *al.* 2000), au niveau du sang et de la moelle osseuse (Grouard et

al. 1997, Sorg et *al.* 1999), du sang placentaire et du thymus (Res et *al.* 1999, Marquez et *al.* 1998).

Les pDCs possèdent une morphologie particulière avec un cytoplasme relativement abondant et basophile, un noyau excentré, ce qui les fait ressembler à des plasmocytes, d'où leur dénomination initiale de cellules T plasmocytoïdes ou monocytes plasmocytoïdes puis de DC plasmocytoïdes (pDC). Elles ont une taille de 8 à 10µm. Sur le plan ultrastructural, elles présentent un réticulum endoplasmique abondant et un appareil de Golgi très développé, suggérant une cellule différenciée possédant une forte capacité sécrétoire et ressemblant là encore à des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (Grouard et *al.* 1997).

En 2000, Dzionek et *al.* ont caractérisé 2 marqueurs, BDCA-2 et BDCA-4 (Blood dendritic cell Antigen), exprimés spécifiquement sur les pDCs circulantes, améliorant et simplifiant l'identification des pDCs en cytométrie en flux par une identification directe de ces cellules (Dzionek et *al.* 2000, Dzionek et *al.* 2001).

2.2.2. Les DCs myéloïdes:

2.2.2.1. Stade de maturation et localisation anatomique :

On retrouve différents types de DC d'origine hématopoïétique localisées dans différents tissus de l'organisme et certains auteurs évoquent que la localisation anatomique des DC pourrait influencer la fonction des DC (Banchereau J et *al.* 2000, Thomson et *al.* 1999, Thomson et *al.* 2002). Par exemple, le groupe d'Angus Thomson de Pittsburgh a montré que les DC hépatiques avaient un rôle tolérogène qui expliquerait le faible rejet lors de greffes hépatiques (O'Connell et *al.* 2002). Cette théorie semble moins être soutenue actuellement car, en fait, la localisation anatomique pourrait être dépendante du stade de maturation et de l'origine des DCs.

On distingue 4 stades dans la différenciation des DCs en relation avec leur localisation anatomique (figure.2.1). Les cellules dendritiques dérivent de progéniteurs hématopoïétiques médullaires. Comme les cellules des autres lignées, la différenciation vers la voie dendritique est finement contrôlée par différents facteurs de croissance, cytokines et par les interactions cellulaires entre les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules de stroma médullaire. Il faut cependant noter que les progéniteurs des DCs peuvent être présents aussi dans différents tissus et générer directement des DCs in situ (dans le thymus par exemple (Ardavin et *al.* 1993) ou les cellules de Langerhans de l'épiderme (Facchetti et *al.* 1991)).

À partir de ces progéniteurs, sont formés des précurseurs circulants (pré-DC) définis par l'absence d'expression de marqueurs spécifiques de lignée (CD3-, CD19-, CD56-) et l'expression des molécules CD4 et HLA de classe II. Ces précurseurs sont retrouvés dans le sang et dans la circulation lymphatique. Dans le sang, on retrouve des DCs à deux stades de maturation différents : les précurseurs de DC (pré-DC-1 CD11c+) qui sont en transit de la moelle osseuse vers les tissus périphériques et les DC immature (DC1) qui se dirigent des tissus périphériques vers les ganglions (Res et *al.* 1999).

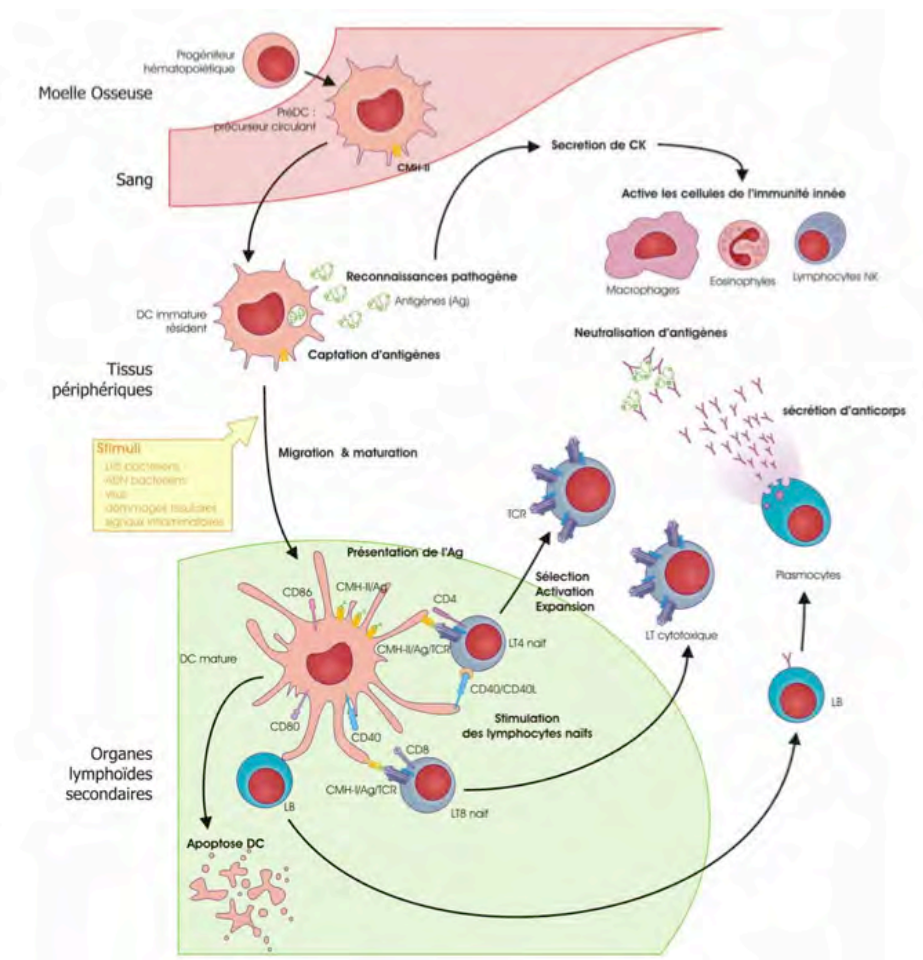


Figure. 2.1: Les 4 stades de maturation des cellules dendritiques myéloïdes.

Les cellules dendritiques dérivent d'un progéniteur hématopoïétique médullaire qui se différencie en précurseur de DC (pré-DC). Celui-ci transite par le sang vers les tissus périphériques où il résidera sous forme de DC immature qui possède des capacités de captation des Ags maximum. La reconnaissance des pathogènes à ce stade pourrait induire la sécrétion de cytokines capable d'activer directement les cellules de l'immunité innée. Sous l'influence de différents stimuli, les DCs mûrissent et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire adaptative par interaction avec les lymphocytes T CD4, CD8 et les lymphocytes B. La maturation des DCs s'accompagne de l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et de l'expression forte du complexe HLA-DR/peptide antigénique en surface de la cellule (Image extraite de Garnache-Ottou, 2004).

Les pré-DC vont migrer vers les tissus périphériques, s'y fixer et y résider sous forme de DCs immatures résidentes. Dans les tissus périphériques, on distingue les DCs interstitielles dans le derme, les DC hépatiques... et les cellules de Langerhans (LC) de l'épiderme cutané qui possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles particulières. Au niveau du thymus, on retrouve une population minoritaire de DCs myéloïdes matures ou immatures (correspondant aux cellules dendritiques interstitielles) (Lanzavecchia et *al.* 2001, Dalloul et *al.* 1999, Facchetti et *al.* 1989) alors que la population majoritaire est constituée de pDC. Le dernier stade de maturation est représenté par les DCs matures qui migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les DCs des organes périphériques ayant migré dans les organes lymphoïdes secondaires sont nommées cellules interdigitées (IDC). On retrouve aussi dans les ganglions les cellules dendritiques centro-folliculaires des centres germinatifs ganglionnaires (Olweus et *al.* 1997, Fitzgerald-Bocarsly et *al.* 1993).

2.2.2.2. Ontogénie des cellules dendritiques myéloïdes:

La différenciation des DCs à partir de progéniteurs CD34⁺ révèle deux voies myéloïdes indépendantes qui passent par 2 précurseurs différents. Ces deux précurseurs de DCs myéloïdes (pré-DC1 ou pré-mDC) expriment tous les deux CD11c⁺ contrairement au précurseur des DCs plasmacytoïdes (Banchereau et *al.* 2000a, Banchereau et *al.* 2000b, Cella et *al.* 2000, Galy et *al.* 2000). Ces 2 précurseurs se différencient sur la base de l'expression du CD14 et du CD1a : (Banchereau et *al.* 2000a) un précurseur CD11c⁺ CD14⁻ CD1a^{fort} (Banchereau et *al.* 2000b) et un précurseur CD11c⁺ CD14⁺ CD1a^{-/+faible} (Ito et *al.* 1999, Steinman et *al.* 2002) (figure.2.2). Le marqueur CD11c forme avec le CD18, le récepteur pour le complément CR4. Chez l'homme, il est aussi exprimé par les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les plaquettes.

La première voie de différenciation dérivée du précurseur CD11c⁺ CD14⁺ CD1a^{-/+faible}, en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et TNF- α (Tumor necrosis factor) donne naissance à des DCs de phénotype CD14⁻ CD1a^{faible} CD68⁺ c'est-à-dire les DCs interstitielles (absence de granules de Birbeck, expression du facteur XIII, du CD2 et du CD68) (Reid et *al.* 2000, Banchereau et *al.* 2000b) (exemple : les DCs dermiques interstitielles). Ce précurseur est aussi capable de générer des macrophages en

présence de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) indiquant bien que cette voie dérive d'un progéniteur myéloïde.

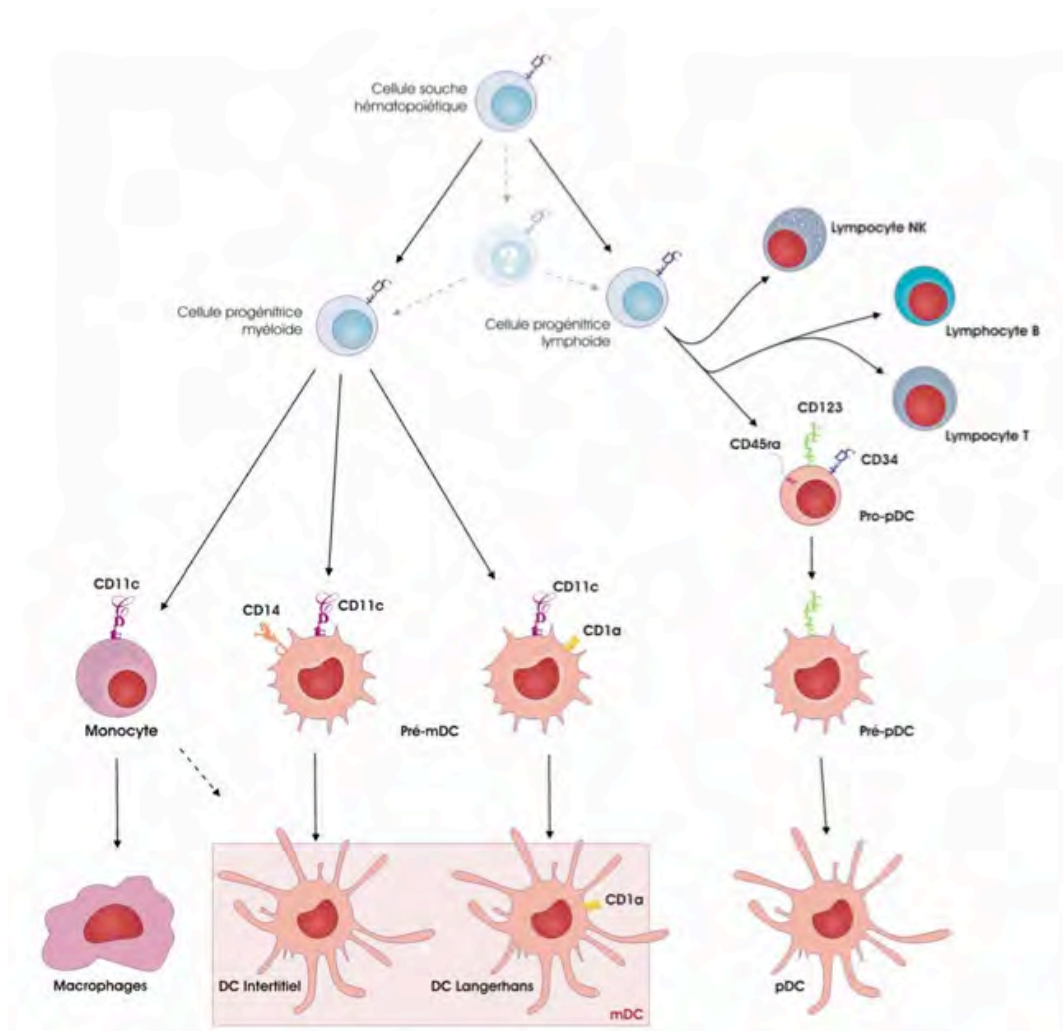


Figure.2.2 : Ontogénie des cellules dendritiques:

Le schéma classique de différenciation des DCs propose dans la littérature (Banchereau et al. 2000a et b) montre 2 voies distinctes pour le développement des mDCs (myéloïde) et pDCs (lymphoïde ?). Le progéniteur myéloïde $CD34^+$ se différencie en précurseur de DCs : les pré-mDCs $CD11c^+$ et les monocytes ($CD14^+ CD11c^+$ capable *in vitro* et vraisemblablement *in vivo* de générer des mDCs). Il existe 2 types de pré-mDC. Le premier ($CD11c^+ CD14^+ CD1a^{-/+faible}$) conduit aux DCs interstitielles (DCs immature puis mature) en réponse au GM-CSF et à l'IL-4. Le second précurseur $CD11c^+ CD14^- CD1a^+$ génère des cellules de Langerhans en réponse au GM-CSF, IL-4 (+/- TGF- β). Le précurseur de pDCs: pré-pDC ($CD14^- CD11c^- CD123^+$) se différencie à partir du progéniteur $CD34^+$ (non encore caractérisé et considéré par certains comme lymphoïde). Un stade intermédiaire (pro-pDC) est identifié ($CD34^+ CD123^+ CD45RA^+$). Le pré-pDC forme des DCs plasmocytoïdes (pDC) matures en présence de différents stimuli (IL-3/CD40L, CpG-ODN, stimulation virale...). Nous verrons par la suite que ces schémas d'ontogénie ne sont peut-être pas aussi tranchés et que le progéniteur des pDCs n'est toujours pas identifié (c'est pourquoi le précurseur intermédiaire hypothétique situé entre la voie myéloïde et lymphoïde est présenté en pointillé). (Image extraite de Garnache-Ottou, 2004).

L'autre voie myéloïde dérivée d'un progéniteur hématopoïétique CD34⁺, CLA⁺ (Cutaneous Leukocyte Antigen) passe par le précurseur pré-DC1 CD11c⁺ CD14⁻ CD1a⁺ et donne une population CD1a^{fort} à tropisme cutané, caractérisée par la présence de granules de Birbeck, Ag Lag +, Langerine et E-Cadherine⁺ : les cellules de Langerhans (Reid et al. 2000, Banchereau et al. 2000a). Cette voie est dite "TGF-β indépendante". Ce précurseur pourrait aussi générer des macrophages en présence de M-CSF suggérant la plasticité du système (Banchereau et al. 2000a, Reid et al. 2000, Caux et al. 1996). A côté de cette voie de différenciation physiologique des cellules de Langerhans, il est aussi possible de générer (tout du moins en culture) des cellules de Langerhans à partir de monocytes en présence de GM-CSF, IL-4 et TGF-β (voie TGF-β dépendante). Bien que les cellules de Langerhans soient apparentées aux DCs myéloïdes (Zhang et al. 1998), des données récentes chez la souris montrent qu'elles pourraient aussi se développer à partir d'un progéniteur lymphoïde (Anjuere et al. 2000, Gluckman et al. 2002). De façon générale, les DCs myéloïdes sont caractérisées par les marqueurs suivants : CD4⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD14⁻ CD116⁺ (récepteur au GM-CSF) CD123^{-/+faible} (récepteur à l'IL-3) CD13⁺ CD33⁺ Lignée B⁻, T⁻, NK⁻ (CD3⁻ CD19⁻ CD56⁻). La plupart de ces marqueurs pris isolément sont partagés avec d'autres types cellulaires, raison pour laquelle la recherche de marqueurs plus spécifiques est nécessaire.

Ainsi, Dzionek et al. ont caractérisé l'expression de différents Ags BDCA (blood dendritic cells antigens) sur les différentes sous-populations de DCs permettant de les différencier entre elles (Dzionek et al. 2000). Classiquement, les mDCs n'expriment pas BDCA-2 et BDCA-4 (neuropilin-1). Par contre, on retrouve deux populations de mDCs dans le sang, basées sur l'expression exclusive de BDCA-3 et BDCA-1. La majeure partie des mDCs sanguines expriment BDCA-1 (CD1c⁺) et n'expriment pas BDCA3. La deuxième population (minoritaire) des mDCs sanguines (CD4⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD45RO⁺ CD123⁻) exprime BDCA3 et n'exprime pas BDCA-1 (Dzionek et al. 2000). Ces cellules, contrairement aux mDCs CD1c⁺, n'expriment pas les récepteurs Fc CD32 (FcγRII), CD64 et FcεRI (16). A noter qu'en culture, BDCA-3 et BDCA-4 sont induites rapidement sur ces cellules et que BDCA-4 est exprimée sur les mDCs générées à partir de CD34⁺ (Dzionek et al. 2000, Dzionek et al. 2002).

Les mDCs ont initialement été nommées DC1 (Patterson et *al.* 2000, Grouard et *al.* 1997), car elles permettraient l'orientation de la réponse immune vers la production de CK de type 1 grâce à leur grande capacité de production d'IL-12 (Interleukine).

Les monocytes (CD14⁺ CD11c⁺ CD1a⁻) représentent aussi des cellules myéloïdes capables de se transformer *in vitro* en mDC (portant l'abréviation Mo-DC) en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Zhou et *al.* 1996). Il existe plusieurs arguments pour penser que la différenciation de monocytes en DCs survient aussi *in vivo*, sous l'influence de cytokines produites localement dans un site inflammatoire. Ainsi, les Mo-DCs représenteraient une voie supplémentaire mise en place dans un contexte particulier pour répondre à un besoin, alors que les DC CD11c⁺ représenteraient la voie classique de différenciation à l'état basal (Osugi et *al.* 2002). Deux études ont montré la présence dans le sang de populations de monocytes HLA-DR⁺ CD4⁺ CD14^{+faible} CD16⁺ possédant des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques différentes des monocytes CD14⁺ CD16⁻ et identifiées comme une nouvelle sous-population de mDCs (Almeida et *al.* 2001). Crawford a aussi montré la présence dans le sang de 24 % de monocytes CD14⁺ CD2⁺ qui, après culture en GM-CSF/IL-4, génèrent des mDC possédant des capacités stimulatrices bien supérieures à celle des mDCs générées à partir de monocytes CD14⁺ CD2⁻ (Crawford et *al.* 1999).

2.2.2.3. Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques myéloïdes et rôle physiologique:

Les DCs myéloïdes immatures tissulaires possèdent un rôle de sentinelle par leur localisation stratégique aux portes d'entrée de l'organisme (Banchereau et *al.* 1998). Ainsi, présentes dans la plupart des tissus périphériques, elles possèdent des capacités maximales de capture (phagocytose, macropinocytose et endocytose), d'apprêtement des Ags et de néosynthèse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Au stade immature, elles expriment de façon préférentielle des molécules HLA de classe I et HLA DR au niveau intracellulaire. En réponse à différents stimuli, comme les pathogènes (lipopolysaccharides bactériens, ADN bactériens...), des dommages tissulaires ou des signaux inflammatoires (TNF- α , IL-1, certaines chimiokines), elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de récepteurs aux chimiokines inflammatoires et certaines molécules d'adhérence. Le processus de maturation les fait passer d'une cellule immature capable de capturer les Ags à une cellule mature capable de présenter le complexe CMH-peptide aux

cellules de l'immunité acquise. Ainsi, elles acquièrent le pouvoir de présenter l'Ag aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs (augmentation de l'expression des molécules du CMH : HLA classe I et HLA-DR, acquisition des molécules d'adhérence et de costimulation CD80, CD86, CD40) (Banchereau et *al.* 1998). L'interaction CD40 avec CD40L exprimé par le lymphocyte T CD4⁺ activé permet la maturation complète de la DC. La DC mature peut ainsi amplifier la réponse spécifique à l'Ag en activant les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes B. La maturation se traduit aussi par des modifications morphologiques, une réorganisation du cytosquelette avec apparition de dendrites, l'expression de différentes intégrines et récepteurs aux chimiokines ainsi que la capacité de sécrétion de l'IL-12. Les DCs peuvent aussi activer la réponse immune non spécifique (activation des macrophages, des éosinophiles, des cellules NK (Banchereau et *al.* 1998)) (figure.2.3).

Deux types majeurs de DCs répondent à ce schéma. Les cellules de Langerhans, qui après prise en charge des Ags au niveau de l'épithélium cutané, migrent au niveau des zones T des ganglions pour devenir des cellules interdigitées et les DCs interstitielles présentes dans tous les autres tissus. Ces deux types de mDC produisent l'IL-12 et sont capables d'activer les lymphocytes T, mais seules les DC interstitielles synthétisent l'IL-10 et jouent un rôle dans la maturation des Lymphocytes B vers le stade ultime de plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (Gluckman et *al.* 2002).

2.2.2.4. Cellules dendritiques myéloïdes et récepteurs de chimiokines : recrutement des cellules dendritiques:

La mobilité est une propriété fondamentale des cellules de l'immunité qui permet la mise en contact des différents effecteurs de la réponse immune dans les différents sites stratégiques de l'organisme. Les DCs possèdent des capacités de mobilité importantes qui sont différentes en fonction de leur stade de maturation (figure.2.4, page 25). Cette migration sélective de la moelle osseuse vers les tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires est extrêmement sophistiquée et fortement régulée. Elle dépend de l'expression de molécules d'adhérence (sélectines et intégrines) et de l'expression différentielle de récepteurs aux chimiokines qui vont leur permettre de se lier spécifiquement à l'endothélium des vaisseaux sanguins d'un organe particulier et de traverser cet endothélium pour migrer dans l'organe. Les DCs nouvellement générées migrent de la moelle osseuse vers les tissus non lymphoïdes (via le sang) où elles deviennent éventuellement résidentes. Ainsi, les DCs

immatures circulantes ont des ligands impliqués dans les étapes du « roulement » du processus d'adhérence et des récepteurs aux chimiokines leur permettant de rouler le long des endothéliums et de répondre aux stimuli inflammatoires afin de gagner les foyers de l'organisme où le signal « danger » a été identifié.

A ce stade, elles expriment les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR4. Elles expriment aussi les récepteurs aux chimiokines inflammatoires: CCR1 et CCR2, CCR3, CCR5 et CXCR1. Ainsi, les DCs immatures répondent à un large spectre de chimiokines via l'expression de différents récepteurs. L'accumulation rapide de DCs en périphérie, au niveau du site d'entrée des Ags, est la conséquence du recrutement de précurseurs de DCs en réponse à la production de chimiokines inflammatoires locales.

On retrouve aussi une sensibilité spécifique de certains sous-groupes de mDC à des chimiokines grâce à l'expression spécifique d'un récepteur donné. Ainsi, les cellules de Langerhans (LC), au stade immature, expriment spécifiquement CCR6, ce qui leur confère la sensibilité à MIP-3 α /CCL20 (MIP pour Macrophage inflammatory protein) alors qu'il n'a aucun effet sur les DCs générés à partir des monocytes (Mo-DC) (Banchereau et *al.* 2000). Ainsi, MIP-3 α /CCL20 induit la migration sélective des précurseurs de LC indépendamment de leur origine. La sécrétion limitée de MIP-3 α au niveau des épithéliums inflammatoires (expression constitutive au niveau des kératinocytes de la peau) explique la domiciliation de cellules de Langerhans immature dans ces tissus.

D'après le modèle de Christophe Caux et al (Caux et *al.* 2002) le recrutement des précurseurs de DC vers les sites inflammatoires est contrôlé par l'action séquentielle des différentes chimiokines : (Banchereau et al. 2000) les DCs CCR2+ circulantes et les monocytes (qui expriment aussi le CCR2) sont mobilisées du sang vers les tissus par l'expression de MCP-4/CCL13 sécrété par les fibroblastes ou les cellules endothéliales. Puis, ces cellules migrent des tissus vers l'épithélium enflammé via la production de MIP-3 α /CCL20 par les cellules épithéliales et l'augmentation d'expression de CCR6 sur les DCs (Steinman et al. 2002).

Cette première phase d'activation (générée par les signaux inflammatoires (IL-1, TNF- α), les agents pathogènes, les signaux délivrés par les lymphocytes T (CD40L, IL-17, IFN- α)) va induire la maturation qui se traduit par les modifications profondes du phénotype de ces DCs et un changement de leur profil migratoire afin qu'ils puissent quitter les tissus et gagner les organes lymphoïdes secondaires. Cela se traduit par la perte de la sensibilité des cellules

aux CK inflammatoires précédemment citées (par régulation négative des ARNm des récepteurs impliqués et saturation des récepteurs par des ligands endogènes sécrétés par DC activée) au profit de l'acquisition de l'expression de CCR7 qui n'était pas exprimée sur les DCs immatures. Toutes les populations de DCs humaines (DC dérivées de progéniteurs CD34+, Mo-DC, DC CD11+ circulantes, DC CD11c-) répondent, lors de leur maturation à CCL19 et CCL21 (ligands de CCR7). Ces 2 chimiokines sont exprimées dans les vaisseaux et ganglions lymphatiques : CCL21 est exprimé sur le HEV (high endothelial venules) et les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et le CCL19 est constitutivement exprimé par les cellules stromales des zones T ganglionnaires.

Alors que les DCs en maturant expriment CCR7, en même temps le CCL21 est induit sur les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, ce qui permet la migration des DCs à travers ces vaisseaux. Les cellules gagnent ainsi les ganglions de drainage de la zone enflammée et se localisent dans la zone T para-corticales grâce à la sécrétion locale de CCL19 et 21. Dans le même temps, les lymphocytes T naïfs (qui expriment aussi CCR7) migrent dans les ganglions grâce à la sécrétion de CCL21 par les veinules post-capillaires (ou HEV). Ils sont dirigés dans les zones T par l'augmentation du gradient de CCL19. Ainsi, CCL19 et 21 qui attirent à la fois les DCs matures et les lymphocytes T naïfs dans les zones T, favorisent leur contact et donc la présentation de l'Ag par les DCs aux lymphocytes T (Caux et *al.* 2002, Dieu et *al.* 1998).

[2.2.2.5. Capture des antigènes par les cellules dendritiques myéloïdes et « Toll-like Receptor »:](#)

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les pathogènes directement par des récepteurs nommés PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui étaient au début définis comme les récepteurs reconnaissant les produits d'agents infectieux (virus , bactéries, champignons, protozoaires) regroupés sous le vocable PAMs (Pathogen-Associated Molecular patterns). La définition des PRRs est étendue maintenant : ils comprennent aussi les récepteurs d'opsonisation (récepteurs Fc ou certaines fractions du complément), d'endocytose et des molécules qui interviennent dans la capture de l'antigène. Ces différentes familles de récepteurs se lient spécifiquement aux différentes classes de pathogènes et permettent la capture des Ags. Ainsi, au stade immature, les DCs sont très efficaces pour la prise en charge des Ags par différentes voies :

*La macropinocytose

*L'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs type lectine C qui reconnaissent les Ags glycosylés (récepteurs au mannose, DEC 205) ou des récepteurs Fcγ (CD64,CD32) qui permettent l'internalisation de complexes immuns.

*La phagocytose de particules ou de corps apoptotiques ou nécrotiques (impliquant le CD36 ou récepteur à la thrombospondine et les intégrines αvβ3 ou αvβ5), de virus et des bactéries.

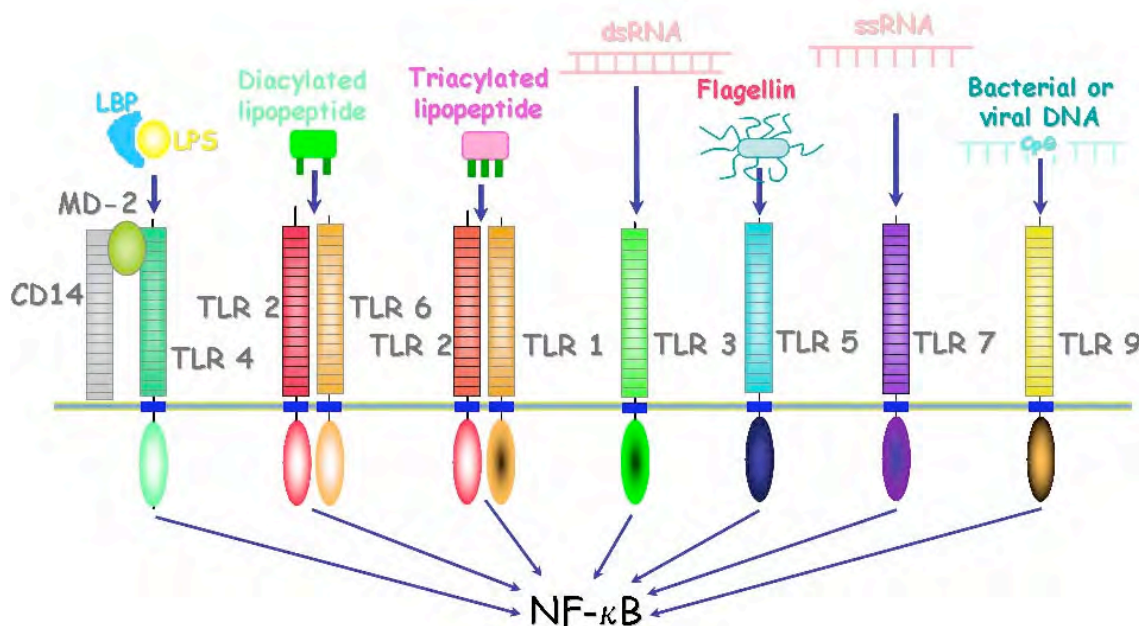


Figure.2.3: L'interaction de TLRs avec des PAMPs spécifiques. Ces interactions induisent le système de signalisation Nf-κB et la voie MAP kinase et ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des molécules de co-stimulation. Ces molécules libérées suite à l'activation du TLR sont la clé de la défense du système immunitaire adaptatif et inné (Doyle and O'Neill, 2006).

Parmi les PRR exprimés par les DCs, les « Toll-Like receptors » (TLR) font l'objet de nombreuses études. Cette famille de récepteurs hautement conservée au cours de l'évolution est constituée de 10 glycoprotéines membranaires (TLR 1 à 10) chez l'homme qui se lient spécifiquement à différents ligands issus de pathogènes et qui, de façon intéressante, sont exprimés différemment entre le mDC et le pDC. Ainsi, les DCs myéloïdes expriment tous les TLRs sauf TLR7 et TLR9 qui sont exprimés spécifiquement par les pDCs. Les données concernant l'expression de TLR7 sur les mDC sont discordantes dans la littérature avec des auteurs qui retrouvent une expression de TLR7 et d'autres non (Hornung et al. 2002, Ito et al. 2002, Jarrossay et al. 2001, Kadowaki et al. 2001, Krug et al. 2001). À noter que les protocoles d'immunothérapie utilisant les mDC pour une vaccination antitumorale ont montré

que l'application cutanée, au site de vaccination, du ligand de TLR7 (imiquimod) pouvait induire la maturation et la migration des DCs cutanées (Shackleton et *al.* 2004).

L'engagement des TLRs à la surface de la DC entraîne des activations intracellulaires spécifiques à chacun et donc à chaque type de pathogène qui initie les mécanismes de maturation de la DC. Cependant, beaucoup de chercheurs s'accordent pour impliquer la protéine adaptatrice MYD88 et l'activation du facteur de transcription NF- κ B dans la voie de signalisation commune aux différents TLRs (figure.2.3). Globalement on peut dire que les mDCs expriment préférentiellement les TLR 2, 3 et 4. Pour exemple, voici différents agonistes des TLR : les peptidoglycanes bactériens pour le TLR2, les ARNs double brin des virus pour le TLR3 (Cella et *al.* 2004), lipopolysaccharides et protéine hsp pour le TLR4 (Coccia et *al.* 2004), la flagelline pour le TLR5, les imidazoquinolines (composés synthétiques antiviraux) pour le TLR7 et TLR8, et les CpG-ADN pour le TLR9.

La liste des récepteurs PRR exprimés par les mDCs est encore longue. Citons seulement : DC-SIGN qui constitue la porte d'entrée de pathogènes comme le VIH et le virus de Ebola (Arrighi et *al.* 2004), CD91 impliqué dans la reconnaissance des protéines de choc thermique (hsp), molécules de stress associées au « signal danger » (Matzinger et *al.* 1998).

2.2.2.6. Voie de signalisation des cellules dendritiques myéloïdes:

In vivo, la maturation des DCs peut être engendrée par différents signaux « danger » : pathogènes (lipopolysaccharides), produits viraux (ARN double brin), stimuli inflammatoires (IL-1, TNF- α ...), dommages cellulaires, nécrose et stress cellulaire. Toutefois, la maturation complète des DCs passe par l'interaction CD40/CD40L délivrée par les Lymphocytes T CD4 activés.

La maturation des mDC s'accompagne de l'augmentation d'expression à la membrane des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, des molécules de costimulation CD80, CD40, CD86, de l'expression de marqueurs de maturation CD83 et DC-LAMP (marqueur lysosomal induit spécifiquement lors de la maturation des DCs (de Saint-Vis et *al.* 1998) et de la sécrétion d'IL-12 (figure.2.4).

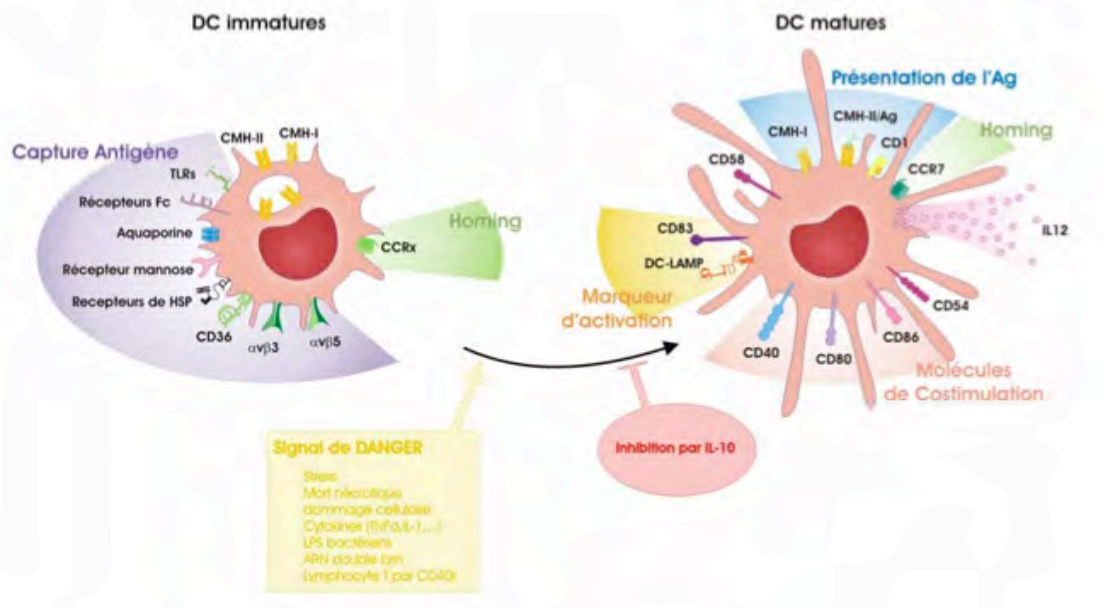


Figure.2.4: La maturation des DCs myéloïdes immatures en DCs matures s'accompagne d'une modification d'expression de nombreux récepteurs. La maturation des mDCs induite par différents stimuli entraîne de profonds remaniements de DC avec en particulier: l'apparition de dendrites, l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86), de marqueurs d'activation (CD83 et DC-LAMP) et l'expression de CCR7 qui permet la domiciliation des DCs au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène (CMH-I et II, CD1) sont exprimées à la surface des DCs et elles sécrètent en fonction des conditions de stimulation des quantités variables d'IL-12. Au stade immature, les DCs expriment de nombreuses molécules et récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la capture des Ags. Les DCs immatures répondent à un large spectre de chimiokines via l'expression de différents récepteurs de chimiokines (notés CCRX) permettant la migration de ces cellules dans les tissus périphériques (Image extraite de Garnache-Ottou, 2004).

2.3. Orientation de la réponse immune:

Après avoir pris en compte l'hétérogénéité des DCs, tant sur le plan de l'état de maturation que sur le plan de l'ontogénie, comment les DC orientent-elles la réponse immunitaire ? Les DCs exercent différentes fonctions, particulièrement dans la régulation de la prolifération des lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T vers un profil de sécrétion de CK de type 1, de type 2, voir 3 ou Tr1 (Galy et *al.* 2000, Patterson et *al.* 2000, Liu et *al.* 2000.). Cette orientation de la réponse immune peut s'effectuer en partie grâce aux profils de production de CK des DCs.

Quelle que soit l'origine de la DC, le stade de maturation oriente la réponse immune. Sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires (cytokines, bactéries, virus), les DCs myéloïdes deviennent matures et induisent une réponse T cytotoxique adaptée (Banchereau et *al.* 1998).

En revanche, un signal incomplet délivré aux lymphocytes T par une cellule dendritique immature (acquisition de la capacité à migrer dans le ganglion sans augmentation des molécules de costimulation et sans redistribution des molécules HLA de compartiment intracellulaire vers la surface membranaire) peut entraîner une inhibition spécifique de ce lymphocyte T (anergie, voir annexe)(Banchereau et *al.* 1998).

Liu et Coll ont suggéré qu'il pourrait exister une relation entre le profil de sécrétion cytokinique et l'origine ontogénique des DCs (voir plus haut DC1/DC2). Initialement, il a été mis en évidence la sécrétion de grandes quantités d'IL-12 par les DCs myéloïdes, suggérant leur rôle dans l'orientation de la réponse T vers un profil de type 1 prédominant. Elles sont appelées pour cela DC1 (sécrétion d'IL-12 notamment). Toutefois, différents auteurs ont montré que ces fonctions n'étaient pas immuables mais adaptables en réponse aux signaux de l'environnement (cytokines notamment) et aux pathogènes rencontrés (Cella et *al.* 2000, Liu et *al.* 2001). Ainsi, les DCs dérivées de monocytes (Mo-DC) qui normalement induisent une réponse de type 1, sont capables d'induire des lymphocytes T dans la production d'IL-4 dans différentes conditions (DC en petit nombre, exposition à différents facteurs comme les prostaglandines E2, les corticostéroïdes) (Banchereau et *al.* 2000 a, Banchereau et *al.* 2000b). Ainsi, les DCs peuvent moduler l'orientation de la réponse immune en fonction de leur environnement.

Un autre paramètre a été identifié récemment : la durée d'activation des DCs. Les Mo-DC produisent d'abord de l'IL-12 (favorisant le développement de réponses de type 1), puis stimulent ensuite les lymphocytes T vers la production de CK de type 2 par épuisement de la sécrétion d'IL-12 (Banchereau et *al.* 2000, Lanzavecchia et *al.* 2000, Langenkamp et *al.* 2000).

Finalement, quatre paramètres peuvent influencer l'orientation de la réponse immune : le type de DC, son stade de maturation, la durée et le type d'activation (Banchereau et *al.* 2000). La théorie « par défaut » invoque que la fonction des DCs est prédéterminé par son origine mais peut être modifiée par le type, la durée d'activation et le signal de maturation. L'ensemble module la réponse engendrée par les lymphocytes T (Cella et *al.* 2000). Au-delà de leur rôle de sentinelle, les DCs sont donc le chef d'orchestre de la réponse immunitaire, la contrôlant dans son orientation, son devenir et sa durée.

CHAPITRE 3 : Les Lectines de type C

3.1. Généralités sur les lectines:

Les structures polysaccharidiques sont très complexes et sont exprimées à la surface des cellules, incorporées dans la matrice extracellulaire ou attachées à des glycoprotéines sécrétées. Ces oligosaccharides peuvent avoir un rôle structural, dans la migration des glycoprotéines vers la surface cellulaire en agissant au niveau soit de l'interaction cellule-cellule soit l'interaction cellule –matrice extracellulaire. Le rôle non structural des sucres implique généralement la participation des protéines dites lectines (Drikamer et Taylor, 1998), pour lesquelles la reconnaissance du sucre implique la présence d'un domaine d'interaction au sein de la séquence protéique de la lectine. Ce domaine d'interaction, impliqué dans la reconnaissance spécifique des structures polysaccharidiques, est désigné par le domaine CRD (pour Carbohydrate Recognition Domain).

Il existe plusieurs groupes de lectines identifiés et qui disposent de propriétés structurales distinctes. En réalité, huit groupes ont été bien identifiés, quatre groupes comportent des lectines essentiellement intracellulaires et les quatre autres incluent les lectines généralement extracellulaires. Les familles de lectines intracellulaires sont: la famille des Calnexines, les lectines de types M, L et P et jouent un rôle dans le trafic intracellulaire ou l'adressage des glycoprotéines. Les familles de lectines extracellulaires sont : les lectines type C, R, les siglecs et la galectines qui sont soit sécrétées dans la matrice extracellulaire ou le liquide corporel, soit localisé au niveau de la membrane cellulaire. Elles sont impliquées dans des nombreuses fonctions telles l'adhésion cellulaire et la reconnaissance des pathogènes. Des nouvelles découvertes pointent que l'existence de groupes additionnels de lectines animales telles que les lectines F-box, les ficolines, les lectines chitinase-like, les lectines F-type et les intelectines (voir tableau.4.1).

Famille de lectines	Les ligands saccharidiques typiques	Localisation
Calnexine	Glc1Man9	RE
Lectine type M	Man8	RE
Lectine type L	Variable	RE, Golgi
Lectine type P	Man 6-phosphate, autre	Voie de sécrétion
Lectine type C	Variable	Membrane cellulaire, extracellulaire
Galectines	b-Galactosides	Cytoplasme, extracellulaire
Lectine type I (siglecs)	Acides sialiques	Membrane cellulaire
Lectine type R	Variable	Golgi, membrane cellulaire
Lectine type F	GlcNAc2	Cytoplasme
Ficolines	GlcNAc, GalNAc	Membrane cellulaire, extracellulaire
Lectine type Chitinase	Chito-oligosaccharides	Extracellulaire
Lectine type F	Oligosaccharides avec un Fucose terminale	Extracellulaire
Intelectines	Gal, galactofuranose, pentoses	Membrane cellulaire, extracellulaire

Tableau.3.1: Liste des lectines, de leurs ligands et de leurs localisations à l'échelle cellulaire
(Drickamer, tableau traduit du <http://www.imperial.ac.uk/research/animallectins/>)

La grande majorité des lectines animales sont des lectines de type C. Les domaines CRDs de type C sont présents dans les protéines d'architecture très différentes : par exemple la protéine HIP-PAP (Hépatocarcinome Intestin Pancréas- Protéine Associée à la Pancréatite) ne possède qu'un CRD isolé (Christa et *al* 1994), alors que les collectines peuvent contenir jusqu'à 18 CRDs. Les différents types de CRDs présentent une spécificité de liaison aux polysaccharides divers: HIP-PAP se lie de préférence au galactose de manière calcium et magnésium dépendante, tandis que le récepteur au mannose lie plutôt le mannose ou le fucose.

3.2. Généralité sur les lectines type C:

Les lectines de type C classiques comprennent un domaine de reconnaissance de sucre (CRD) qui fixe des oligosaccharides de façon Ca^{2+} dépendante. L'ion Ca^{2+} est également impliqué dans le maintien de l'intégrité structurale des CRD, indispensable pour le bon fonctionnement de la lectine.

Les Lectines de type C sont soit des protéines transmembranaires, soit sécrétées en tant que protéines solubles. Les lectines de type C solubles incluent des membres de la famille des collectines comme la protéine A présente au niveau du surfactant pulmonaire (SP-A), la protéine D sécrétée à la surface luminale des cellules épithéliales pulmonaire (SP-D) et la protéine reconnaissant le mannose (MBP) qui est une collectine présente dans le plasma sanguin.

Les lectines transmembranaires de type C sont divisées en deux groupes suivant l'orientation de leur groupe amine terminal. Les lectines type I et type II correspondent respectivement à une orientation extracellulaire et intracellulaire du groupe amine terminal. Exemple de lectines type C transmembranaires: les sélectines, la famille des récepteurs de mannose (MR) et la lectine DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin).

Dans le système immunitaire, les lectines de type C interviennent dans l'adhésion et dans la reconnaissance des pathogènes. L'adhésion cellule-cellule est la fonction principale des sélectines, d'autres comme les collectines sont spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes. Curieusement, la lectine DC-SIGN est à la fois une lectine responsable de l'adhésion cellulaire et de la reconnaissance des pathogènes. En tant que récepteur d'adhésion, DC-SIGN en interagissant avec l'ICAM-3 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-3) établit le contact entre la cellule dendritique (DCs) et le lymphocyte T. A cela, s'ajoute son rôle dans la migration des DCs en interagissant avec l'ICAM-2 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-2) des cellules endothéliales. En tant que récepteur des pathogènes, DC-SIGN reconnaît des pathogènes viraux, des parasites, des levures... Récemment la famille de MRs principalement connue comme récepteurs à pathogènes, s'est avérée responsable de l'adhésion des cellules endothéliales du tissu lymphatiques aux lymphocytes.

3.3. Les différentes lectines de type C identifiées:

Il existe 14 grandes familles appartenant à la classe des lectines de type C, elles sont représentées dans la figure.3.2. Parmi ces familles, seules les collectines, les MRs et les sélectines seront détaillées:

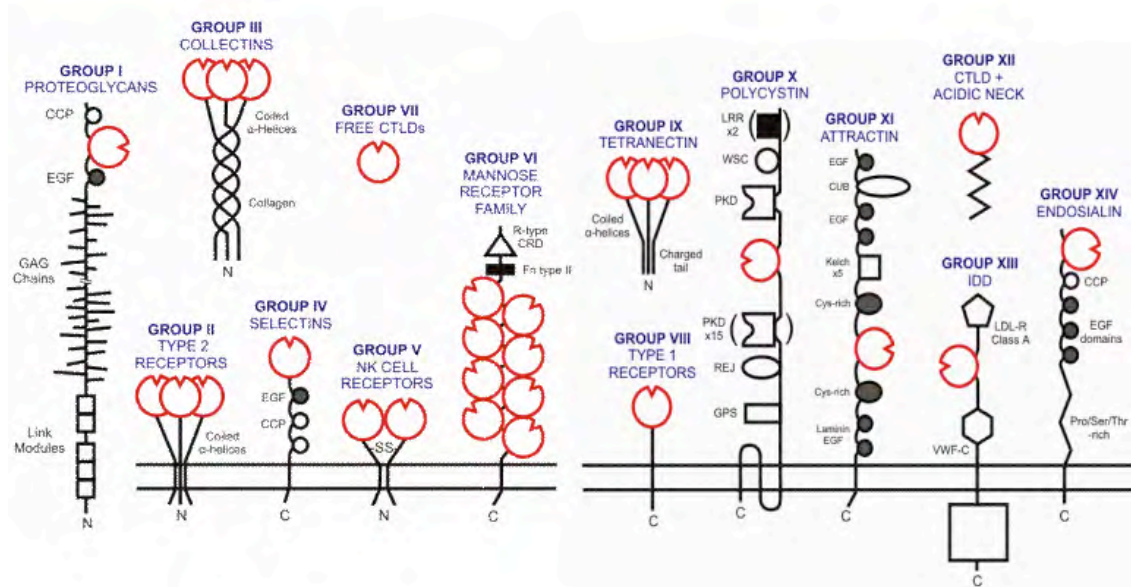


Figure.3.2: Les différents groupes de lectines de type C identifiés. En rouge est présenté le domaine CTLDs (<http://www.imperial.ac.uk/research/animallectins/>). Toutes ces lectines de type C disposent obligatoirement d'au moins un domaine CTLDs responsable de la reconnaissance de sucre. Le domaine CTLDs proposé par Drickamer est un domaine qui ressemble au domaine CRD mais qui ne reconnaît pas forcément les sucres sauf dans le cas des lectines types C. Quant à l'organisation générale, elle est très variable au sein de cette famille de lectines.

3.3.1. La famille des collectines:

Il s'agit de récepteurs qui s'organisent en larges homo-oligomères. Ils disposent d'un domaine collagène du côté N-terminal et d'un CRD du côté C-terminal (Drickamer et Taylor 1993). Deux sous-groupes de collectines peuvent être distingués par la longueur de leur domaine collagène (qui, lui, est constitué d'un petit nombre de motifs répétés Gly-X-Y). Selon le nombre de motifs répétés, ces lectines s'organisent en bouquet ou en structures cruciformes (figure.3.3 et figure.3.4).

MBP-A	GTPGRDGRDRPKGEKGEPGQGLRGLQGPPGKMPPGNTGTSGIPGPRGQ KGDRGDN
MBP-C	GINGFPGKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPPGKLPPGNPGPSGSPGPK GQKGDPGKS
SP-A1	GSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGLKGDPGPPGPMGPPGEMPCPPGNDGLPG APGIPGECGEKGEPGERGPPGLP
SP-A2	GSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGVKGDPGPPGPMGPPGETPCPPGNNGLPG APGVPGERGEKGEGGERGPPGLP
SP-D	GLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVG EPGPKGDTGPSGPPGPPGVPGAGREGALGKQGNIGPQGKP

Figure.3.3 : Alignement des séquences du domaine collagène du MBP-A, MBP-C, SP-A1, SP-A2 et SP-D. Le domaine de collagène est composé de plusieurs motifs répétés (G-X-Y).

Même si la structure exacte du domaine de collagène n'est pas encore résolue, il ressemble au vrai collagène par la séquence et par la présence d'une modification post-traductionnelle comme l'hydroxylation des prolines, l'hydroxylation et la glycosylation des lysines, et dans la formation d'un domaine trimérique qui s'assemble ensuite en un large oligomère (Wallis et Drickamer 1997).

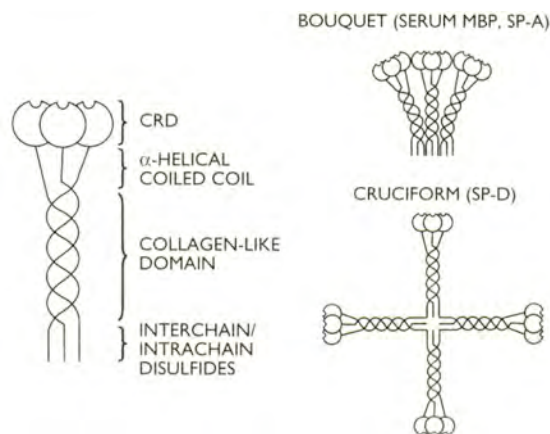


Figure.3.4: L'organisation des domaines de collectines. À gauche : l'organisation simple trimérique de la collectines, à droite : les formes cruciformes et en bouquet des collectines (Wallis et Drickamer 1997).

Ce type de collectines est connu comme étant impliqué dans la réponse immunitaire innée, il comprend les MBPs (mannose binding lectin) et deux protéines du surfactant SP-A et SP-B. Les MBPs et SP-A sont organisés en bouquet contenant deux des six bloc de

construction, dont chacun est constitué d'un assemblage de trimères. Alors que la SP-D (plus longue) est cruciforme, constituée de quatre unités trimériques (figure.3.4). De ces trois collectines, la MBP est la plus étudiée en termes de structure et de fonction biologique. Il semble que la MBP joue un rôle dans les mécanismes de défense primaire en fixant le complément (Ikeda *et al.* 1987). Une interaction directe avec les bactéries et les champignons contourne le besoin de fixer des anticorps pour induire ensuite l'opsonisation. La MBP remplit la fonction de reconnaissance des anticorps et déclenche la cascade du complément de la même façon que la protéine du complément C1q (figure.3.5).

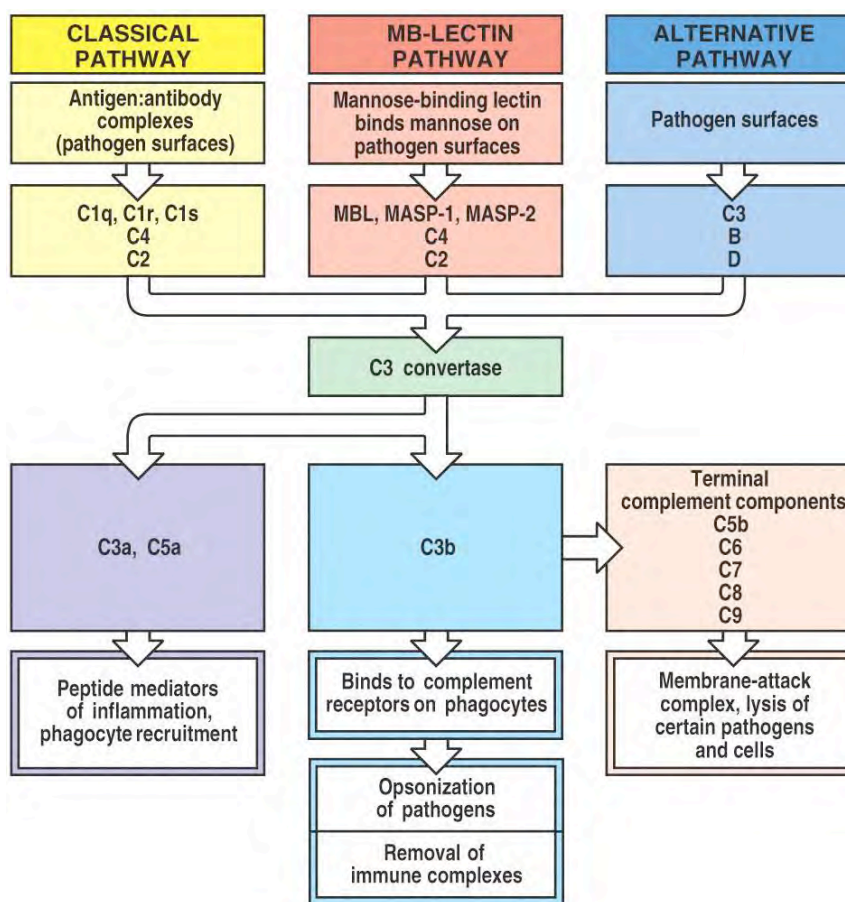


Figure.3.5. : Les trois voies d'activation du complément (Garland *et al.* 2005).

Comme dans le cas de C1q, l'initiation de la cascade du complément par la MBP inclut l'activation d'une protéase clé. Les protéases à serine associées à la MBP (MASP-1 et MASP-2) sont homologues aux protéases C1r et C1s associées au C1q, et elles partagent la capacité d'activer le complément C4 et C2 et ainsi catalyser la deuxième étape de la cascade de complément classique (Takayama *et al.* 1994, Thiel *et al.* 1997). Cette voie conduit à la

libération de C3b et l'opsonisation ainsi que la formation du complexe d'attaque des membranes. Une autre voie alternative pour la neutralisation des pathogènes a été proposée, dans laquelle l'ensemble C1q/collectine peut directement se lier au domaine de collagène de la MBP, induisant potentiellement la phagocytose (Malhotra et al. 1993, Tenner et al. 1995). Néanmoins l'importance de cette voie *in vivo* demeure à établir.

Les pathogènes qui sont reconnus par les MBPs incluent les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli*, *Salmonella montevideo*, *Mycobacterium tuberculosis* et les champignons de type *Candida* et *Cryptococcus* (Epstein et al. 1996). La MBP est également identifiée comme étant capable d'interagir avec de nombreuses enveloppes virales, conduisant à leur opsonisation et au blocage de leur activité (Epstein et al. 1996). La participation de la MBP dans les phénomènes de l'immunité a clairement été démontrée. Ainsi, une diminution du taux de MBPs fonctionnels dans le sérum a pu être corrélée à des infections fongiques et bactériennes récurrentes développées chez certains des patients (Summerfield et al. 1993). Ces symptômes sont normalement évidents au début de la vie durant un intervalle où les anticorps maternels sont à l'origine de la défense et avant que le corps humain ne dispose d'un répertoire d'anticorps capable de déclencher une réponse immune. Ce syndrome résulte d'une mutation au niveau de différents sites de la portion collagène de la MBP, qui interfère dans la formation des oligomères.

Les protéines du surfactant SP-A et SP-B sont considérées comme la première barrière de défense contre les pathogènes présents dans les aérosols, et sont présentes dans le liquide alvéolaire du poumon. En accord avec cette théorie, SP-A se lie à *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* parmi les bactéries, alors que la SP-D interagit avec *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, et les deux protéines lient *Pneumocystis carinii* (Epstein et al. 1996). Cependant aucune de ces protéines n'est capable de fixer les molécules du complément suggérant que le mécanisme de neutralisation devra se faire par d'autres voies. La nature polyvalente très importante de ces protéines suggère qu'une de leurs fonctions est de causer l'agréation des bactéries. Ces agrégats sont ensuite éliminés par le mouvement de fluide du surfactant assuré par les cils présents à la surface apicale des cellules épithéliales de type I qui tapissent la paroi alvéolaire. Certains récepteurs spécifiques peuvent néanmoins médier l'interaction avec les macrophages, conduisant à une phagocytose sélective.

3.3.1.1. L'analyse structural des collectines :

Les MBPs et d'autres collectines comportent 4 domaines distincts au niveau de leurs séquences peptidiques (figure.3.6).

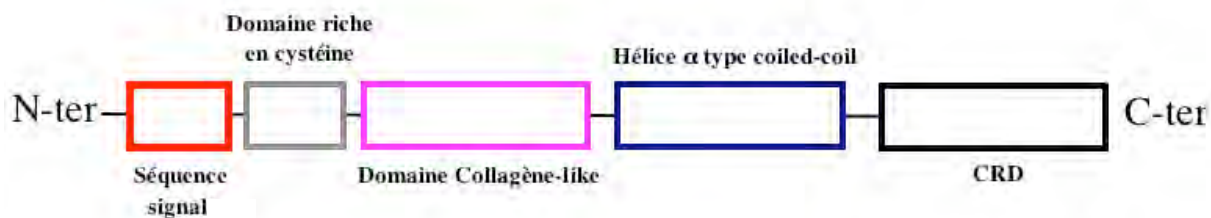


Figure.3.6: Représentation schématique des domaines présents au niveau des collectines : la séquence signal en N-ter, le domaine riche en cystéine, le domaine collagène-like, les hélices α type Coiled-coil, le domaine de reconnaissance de sucre (CRD) en C-ter.

Le court (≈ 30 résidus) domaine N-terminal comporte une séquence signal et un domaine disposant de plusieurs cystéines (domaine Cys-riche). Ces cystéines forment des ponts disulfures interchaîne qui stabilisent le trimère (Wallis et Drickamer 1997) (figure.3.7).

A. domaine riche en cystéine :

MBP-A	PSFPVLLLSVVTASCS-----KTKACADTQKTC-SMITCGIPVTN
MBP-C	MSLFPSLPLLLLSMVAASYS-----ETVTCEDAQKTCPAVIACSSP
SP-A1	MWLCPLALNLILMAASGAA-----CEVKDVCV
SP-A2	MWLCPLALNLILMAASGAA-----CEVKDVCV
SP-D	MLLFLLSALVLLTQPLGYLE--AEMKTYSHRTMPSAC-TLVMCSSVES

B. Région Neck (type Coiled-coil) :

MBP-A	SVAEAKLANLERKLSRSELDHTKKN*AFSLGKM
MBP-C	PDGDSSLAASERKALQTEMARIKKWLTFSLGKQ
SP-A1	AHLDEELQATLHDERHQILQTRGALSLOGSIMT
SP-A2	AHLDEELQATLHDERHQILQTRGALSLOGSIMT
SP-D	DVASLRQQVEALQGQVQHQAQFSQYKKVELFPNGQS

Figure.3.7 : Les séquences du domaine riche en cystéine (A) et de la région Neck (B). En A: Les lettres marquées en jaune correspondent à des cystéines impliquées dans des ponts disulfures; En B : Les lettres marquées en vert correspondent à la position des acides aminés hydrophobes impliqués dans des interactions interhélicales de type coiled-coil et en étoile est noté les acides aminés variables.

Celui-ci est suivi par 18 à 20 répétitions de Gly-X-Y, une région neck de 30 résidus qui comporte des hélices α formant des interactions type coiled-coil, et un CRD de 115 acides aminés en C-terminal. Le traitement par une collagénase spécifique de la structure triple hélices indique que des telles structures sont présentes chez les MBPs (Drickamer et al. 1986). Cependant, la MBP recombinante comportant la région neck et le domaine CRD est

trimérique (Childs et *al.* 1990; Weis et *al.* 1991, Weis et *al.* 1994, Sheriff et *al.* 1994). La digestion de cette protéine par la subtilisine libère les CRDs (Weis et *al.* 1991, Ng et *al.* 1996), indiquant que le Neck agit comme un domaine de trimérisation. L'activité spécifique de l'interaction de la protéine avec les sucres est maintenue pour un CRD isolé (Weis et *al.* 1991, Ng et *al.* 1996), indiquant que l'activité des lectines est totalement due à ce domaine.

La structure du CRD du MBP présentée dans la figure 3.8 comporte deux ions calcium, qu'on désigne par site 1 et 2, avec un appariement du premier et du dernier brin β qui place le N-ter et la C-ter du CRD proche l'un de l'autre. Cet arrangement explique l'observation où les CRD des lectines de type C peuvent être localisées n'importe où au niveau de la chaîne polypeptidique. Dans de nombreuses lectines de type C, les CRDs sont situés soit au niveau de l'extrémité C-terminal soit N-terminal, alors que dans d'autres les CRDs sont situés au sein de la chaîne et encerclés des deux côtés par différents modules. Cette topologie dites « Loopout » permet aux CRDs présents dans les lectines membranaires d'adopter une même orientation par rapport à la surface qu'ils soient localisés du côté N-terminal, comme c'est le cas des sélectines, ou du côté C-terminal de différents récepteur type II, comme c'est le cas à la surface des cellules NK (natural killer) (Drickamer et Taylor 1993).

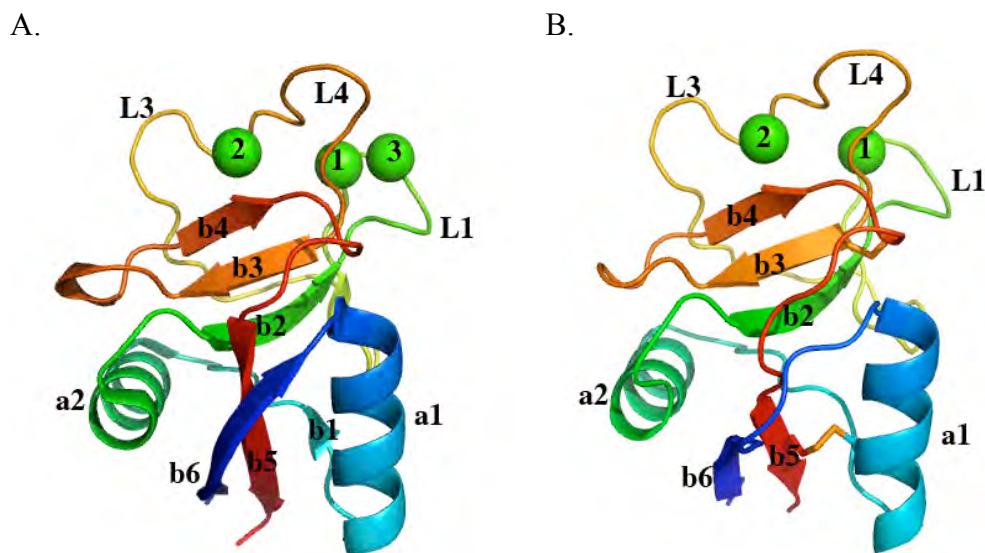


Figure.3.8: Structure du CRD de la MBP-A (A) et la MBP-C (C) : les hélices α , les feuillet β et les boucles sont indiqués respectivement par a, b et L. Les 2 ions calcium sont représentés par des sphères et les ponts disulfures sont montrés par le trait jaune. l'organisation spatiale des deux structures CRDs sont quasi identiques, la MBP-A dans cette structure (PDB: 2MSB, Weis et *al.* 1992) dispose d'un ion calcium supplémentaire par rapport à la MBP-C (PDB:1RDO, Ng et *al.* 1996). En effet, il semble que la présence du calcium 3 est un artifice dû à la contrainte structurale (Weis et *al.* 1998).

L'alignement des séquences pour l'analyse structurale des lectines de type C révèle des séquences déterminantes dans le repliement de la structure (Weis et *al.* 1991). Il existe deux ponts disulfures formés par quatre cystéines invariantes: le pont qui se trouve vers l'extérieure lie la première hélice α à la dernière chaîne β , et le pont interne lie le début de la troisième chaîne β à la boucle qui suit la quatrième chaîne β (figure.3.9).

```

MBP-A SGKKLFVTNGERMPSKVKALCAGLQATVAAPKNAEENKAIQD--- VAKDTAFLGITDEATEG
MBP-V   GNKFFLTNGEIMTFEKVKALCVKFQASVATPRNAAENGAIQN---IKEEAFLGITDEKTEG
SP-A1  VGEKVFSSNGQSITFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIAS-FVKKYNTYAYVGLTEGPSPG
SP-A2  VGEKVFSSNGQSITFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIAS-FVKKYNTYEVVGLTEGPSPG
SP-D   VGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAANAALQQ-LVVAKNEAAFLSMTDSKTEG

MBP-A QFMYLT-GGRLTYSNWKKDEPNDDHSGSEDCVILLNGLWNGISCTSSFIAICEFPA
MBP-C QFVDLT-GNRLTYTNWNEGEPNNAAGSDEDCVLLLNKGQWNDVPCSTSHLAVCEFPI
SP-A1  DFRYSD-GTPVNYTNWYRGEPAGRG-KEQCVEMYTDGQWNDNRNCLYSRLTICEF
SP-A2  DFRYSD-GTPVNYTNWYRGEPAGRG-KEQCVEMYTDGQWNDNRNCLYSRLTICEF
SP-D   KFTYPT-GESLVYSNWAPGEPNDDGGSSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF

```

Figure.3.9 : Représentation des séquences du domaine CRD des 5 membres de la famille des collectines: en jaune les résidus conservés, en bleu les résidus qui fixent le calcium au site 1(rôle structural) et en violet les résidus qui se trouvent dans le site 2 et qui lie le calcium et le sucre.

Une deuxième série de résidus conservés forme les sites de fixation du calcium. La MBP (A et C) comporte deux sites de Ca^{2+} , identifiées dans la structure cristalline résolue et par les données biochimiques démontrant la dépendance de l'interaction à la présence du calcium et la résistance à la protéolyse (Weis et *al.* 1991). Les deux sites calcium sont très bien conservés, au sein des lectines de type C, même si la selectine ne possède pas de site 1 conformément à la structure cristallographique résolue (Graves et *al.* 1994). Le site qui demeure conservé comporte le cœur hydrophobe de la molécule. Les régions qui demeurent significativement différentes parmi les CRDs de la lectine de type C, incluant des délétions et des insertions, couvrent la surface et les boucles des CRDs du MBP.

Le repliement structural des CRDs des lectines de type C est déjà défini. Le tronc commun des membres de cette famille comprend la dépendance au calcium pour les interactions et la stabilisation aux protéases (Weis et *al.* 1991, Loeb et *al.* 1998, Mullin et *al.* 1994, Anostario et *al.* 1995). Cette protection a été attribuée à la stabilité au niveau des différentes boucles et au changement conformationnel induit par la fixation du calcium (Ng et *al.* 1996).

3.3.1.2. Domaine de reconnaissance des sucres par les MBPs:

La MBP dispose d'une large échelle de reconnaissance spécifique en accord avec leur besoin d'identifier une variété des surfaces. Les ligands monosaccharidiques qui lui sont spécifiques sont le D-mannose, le N-acétyl-D-glucosamine et le L-fucose. Le profil en commun à tous ces sucres est la présence vicinale des groupements hydroxyles, c'est-à-dire en position équatorial, en 3'- et 4'-OH de D-mannose.

À l'opposé, les MBPs ne lient pas les D-galactosides qui, avec un 4'-OH axial, possèdent une stéréochimie différente. Cette spécificité est particulièrement visible dans la famille des lectines de type C : les membres de la famille des lectines normalement tombent soit dans la classe de ligand type mannose, reconnaissant le sucre de type vicinal (4'-OH équatorial), ou la classe de ligand type galactose, qui interagit avec les galactosides et leur dérivés. Les sites actifs des lectines de type C qui reconnaissent le mannose dispose d'une séquence conservée comportant un motif EPN. Par contre, ceux qui reconnaissent le galactose dispose d'un motif conservé type QPN.

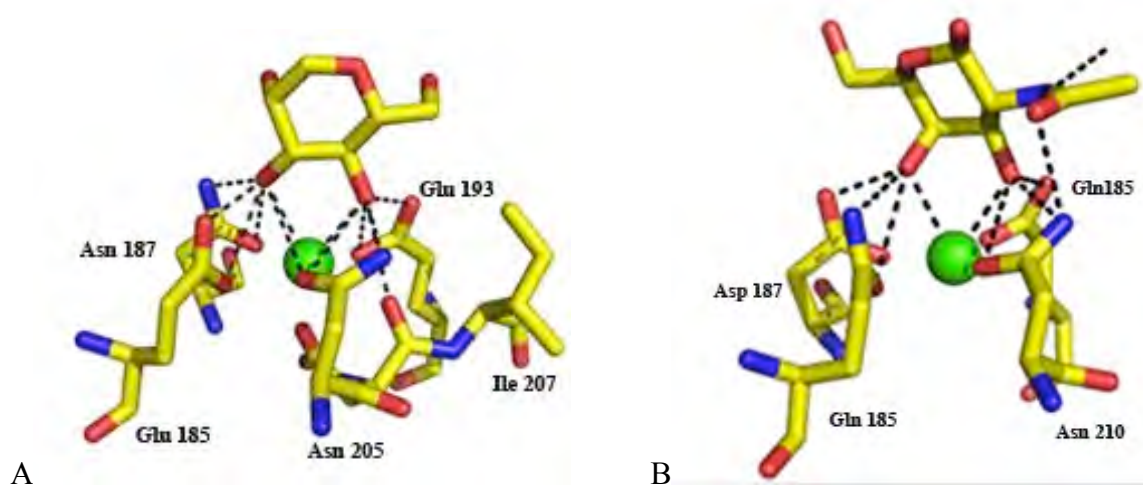


Figure.3.10:La fixation du mannose (A) et du N-acétyl galactoside (B) par le calcium au niveau du site 2 de la MBP-A. Les brins en rouge, bleu et jaune représentent l'atome d'oxygène, d'azote et de carbone respectivement. En pointillé sont représentées les interactions polaires. Le site actif non muté est représenté en (A) alors qu'en B le site actif du MBP-A a été muté (Glu185Gln, Asn187Asp, His189Trp, Gly190Tyr et Ser191Gly) (fichier PDB : 2SMB, Weis et al. 1992 et PDB:1BCH, Drickamer et al. 1992).

Les bases de la structure de MBP et la spécificité des lectines de type C ont été analysées par des structures cristallographiques résolues de deux protéines de rat, la MBP-A du sérum et la MBP-C associée au foie. La structure du MBP-A en interaction avec

l'oligosaccharide (Weis et *al.* 1992) et une série de structure de MBP-C complexées avec du méthyl- glycoside, du mannose, N-acétyl-D-glucosamine, et du fucose (Ng et *al.* 1996), ont révélé le profil d'interaction. L'interaction se fait par une coordination directe avec le calcium du site 2. C'est une interaction qui utilise la liaison non-covalente avec les OH en position 3 et 4 du ligand (figure.3.10). Un groupe OH dispose de deux doublets électroniques libres et un proton disponible pour des interactions non-covalentes. Chacun des groupes OH participe avec une de ses doublets à une liaison de coordination avec l'ion calcium. Le deuxième doublet est utilisé comme un accepteur impliqué dans les liaisons hydrogènes du groupe amine appartenant à deux résidus asparagine, et le proton participe à une liaison hydrogène avec l'oxygène d'un acide aminé. Les résidus qui forment les ponts hydrogènes avec le 3'-OH et le 4'-OH utilise l'oxygène libre au niveau de leur chaîne latérale pour réaliser une coordination avec le Ca^{2+} , formant ainsi une interaction ternaire entre le Ca^{2+} , le sucre et la protéine. Le Ca^{2+} impliqué dans une liaison de coordination s'organise en une géométrie bipyramidale, avec deux OH de deux sucres différents occupant les sommets de chaque pyramide (figure.3.10).

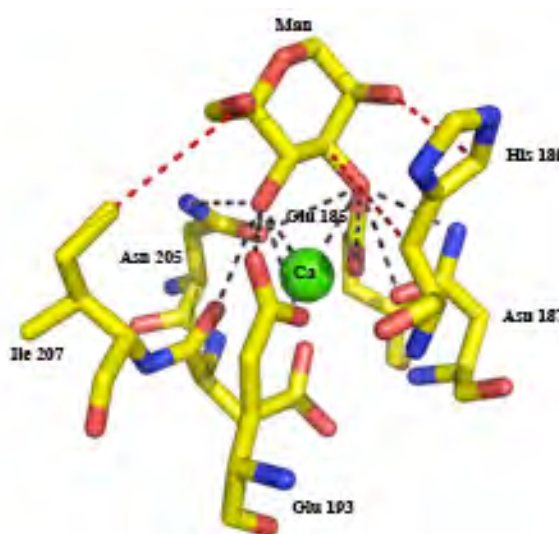


Figure.3.11:représentation de toute les interactions impliqués dans la fixation du mannose (A) par le calcium au niveau du site 2 de la MBP-A. Les brins en rouge, bleu et jaune représentent l'atome d'oxygène, d'azote et de carbone respectivement. En pointillé noires et rouges sont représentées les interactions polaires et de van der Waals respectivement. La sphère de coordination et d'interaction d'hydrogène du mannose et du calcium sont réalisés avec les acides aminés Asn187, Glu185, Asn205 et Glu193. Les interactions de Van der Waals sont réalisées entre le mannose et les résidus His 189 et Ile 207 (PDB :2SMB , Weis et *al.* 1992).

En absence du sucre, cette position est occupée par des molécules d'eau, démontrant que la fixation du calcium réalise des liaisons de coordination et déplace deux molécules d'eau (Ng et *al.* 1996). Un aspect remarquable de l'interaction du mannose avec les MBPs est la

densité des interactions réalisées en dehors des coordinations et des ponts hydrogènes. Dans le cas du MBP-A, il existe trois interactions de van der Waals observées dans la structure cristallographique (figure.3.11): le C4 du Mannose est en contact avec le C β de l'histidine 189 du MBP-A, du 2'-OH est en contact avec le carbone de l'histidine, et le C6 hexocyclique en contact avec le groupe méthyle terminal de l'isoleucine 207. La mutagenèse dirigée révèle que seule l'interaction C4-C β est énergétiquement significative (Iobst et *al.* 1994) : le remplacement de l'histidine 189 par l'alanine a un faible effet sur l'interaction, et un résultat similaire est obtenu pour l'isoleucine 207 si elle est remplacée par la valine. Néanmoins le remplacement de l'histidine 189 par la glycine, qui enlève le contact avec C β , réduit d'une façon importante l'affinité pour le mannose. Ces études démontrent la difficulté de pouvoir attribuer le rôle énergétique par les simples observations cristallographiques. Dans la MBP-C, l'histidine est remplacée par la valine, qui elle réalise des contacts équivalents avec l'anneau cyclique du sucre.

La faible interaction entre la MBP et le sucre reflète la large gamme de spécificité nécessaire pour ces protéines. L'interaction des MBP-C avec du méthyl- glycosides, du N-acétylglucosamine et du fucose confirme que les contacts entre les groupes hydroxyles de 3'- et 4'-OH sont les principaux déterminants de la reconnaissance. Di, tri et des plus longues chaînes d'oligomannoses interagissant avec le MBP-A et MBP-C confirment que ces sites n'interagissent qu'avec des sucres (Weis et *al.* 1992).

Connaissant la spécificité pour les monosaccharides retrouvés chez les vertébrés ainsi que sur la surface cellulaire des microorganismes, une question se pose sur l'absence d'activation du système du complément qui induit la lyse ou sur l'absence de l'opsonisation par l'hôte. D'une part, la réponse provient de la densité relative qu'occupe le fucose, le mannose terminal et le GlcNAC chez les glycoprotéines et les glycolipides des vertébrés.

Néanmoins, la structure des MBPs a pour fonction principale de distinguer les envahisseurs et le soi. Comme les autres lectines, l'interaction entre les MBPs et les ligands monovalents sont extrêmement faibles, avec un Kd typique de 2mM (Weis et *al.* 1996). Les lectines réalisent une interaction spécifique et fine grâce à l'interaction multivalente (Weis et *al.* 1996). Dans le cas d'une interaction réalisée par des sites indépendants, l'énergie de l'interaction totale serait la somme des interactions individuelles réalisées par chaque CRD présent. Ainsi le regroupement des CRDs en « patch » permet d'améliorer encore plus l'affinité. En réalité, les contraintes géométriques rendent impossible une interaction

individuelle et indépendante, néanmoins l'affinité est beaucoup plus importante. Par exemple, les levures du mannane ou les néoglycoprotéines du sérum albumine bovin sur lesquelles sont greffées des unités mannose (20 ou plus de moles de mannose /mole de protéine), déploie une constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire dans différents essais d'interaction avec la MBP-A par rapport aux monosaccharides qui ont une constante d'inhibition de l'ordre du millimolaire (Lee et *al.* 1991).

La structure cristalline de la MBP-A du rat (Weis et *al.* 1994) et du trimère de la MBP-humaine (Sheriff et *al.* 1994, figure.3.12) fournit une explication pour la capacité des MBPs à distinguer les corps étrangers du Soi. La région Neck est constituée des hélices formées de 30 résidus qui forment un trimère en coiled-coil parallèle (figure.3.12).

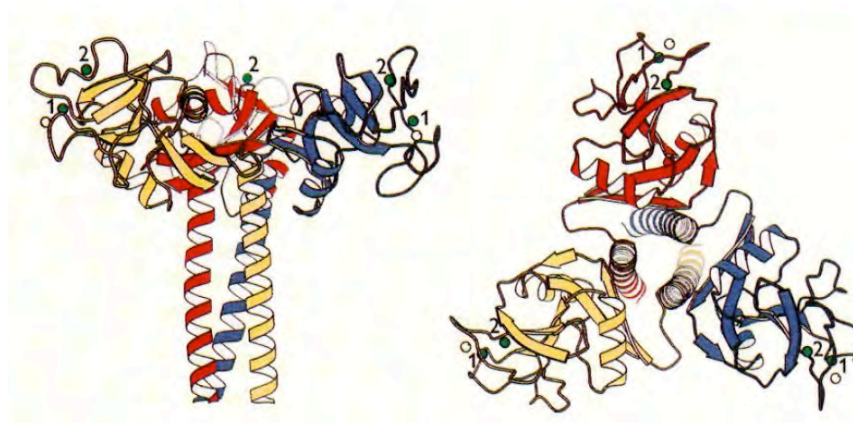


Figure.3.12:Structure en ruban du trimère de la MBP-A. Les ions calcium sont présentés en vert. Une vue axiale du trimère est présentée à gauche et une vue d'en haut est présentée à droite. Les 3 monomères sont colorés en rouge, bleu et jaune. Le calcium « 1 » dispose d'un rôle structural, le calcium « 2 » se trouve dans le site de reconnaissance de sucre ((image extraite de Weis et *al.* 1998).

Une interface hydrophobe entre le neck et le COOH-terminaux du CRD maintient une relation spatiale entre le Neck et la lectine, comme les sites d'interactions sont distants du trimère par 53 Å (rat) et 45 Å (l'humain). La spectroscopie et la modélisation de l'interaction ont permis de démontrer que le mannose terminal dans les oligosaccharides hautement mannosylés sont de 20 à 30 Å de distance (Lee et *al.* 1992, Lee et *al.* 1991). Les sites d'interaction du trimère de la MBP sont trop loin l'un de l'autre pour interagir d'une façon multivalente avec de tels oligosaccharides ; en réalité, les oligosaccharides hautement mannosylés des vertébrés interagissent avec les MBPs avec une affinité comparable à un

simple mannosides (Lee et *al.* 1991). Au contraire, les surfaces cellulaires des pathogènes, qui sont les cellules bactériennes et les structures hautement mannosylés sur les surfaces fongiques présentent une dense surface de motifs répétés du ligand qui peut couvrir la surface entre les sites de fixation des MBPs, conduisant à une interaction multivalente, hautement avide. La spécificité biologique du MBPs ainsi réside essentiellement dans la structure oligomérique qui s'oppose au site d'interaction individuel (Weis et *al.* 1994, Sheriff et *al.* 1994).

3.3.1.3. Modalité de reconnaissance des sucres par les autres lectines de type C:

La MBP-A a fait la preuve d'être un excellent modèle d'études pour les facteurs déterminants dans la spécificité osidique des lectines de type C. L'interaction limitée réalisée par la MBP-A avec ses ligands permet de développer de nouvelles molécules spécifiques en réalisant une modélisation de l'interaction d'un sucre de choix avec la structure du CRD résolue. Par exemple, un alignement de séquence a démontré que la paire de Glu/Asn du motif EPN à la position 185 et 187 de la MBP-A (figure.3.10) sont présents dans les membres des familles spécifiques des ligands type mannose, alors que les lectines types C qui reconnaissent les ligands type galactose disposent du Gln et de l'Asp à cette position (motif QPN). Le remplacement du Glu 185 et Asn 187 de la MBP-A par Gln et Asp, respectivement, confère à la MBP-A une interaction préférentielle pour les galactosides (Drickamer et *al.* 1992). Des études de comparaison supplémentaires de séquences couplées à des mutagenèses dirigées ont identifié d'autres facteurs déterminants dans la spécificité pour le galactose (Iobst et *al.* 1994). Des résolutions de la structure cristallographique de ces mutants complexés à leurs ligands ont fourni des informations importantes sur la spécificité des lectines de type C pour le galactose (Kolatkhar et *al.* 1996). En effet, le 3'- et 4'-OH du galactose forme une structure de coordination avec le Ca^{2+} et des ponts hydrogènes similaires, malgré la stéréochimie différente de ce ligand. Ces résultats mettent en valeur le rôle central joué par l'ion calcium et ses ligands dans la détermination de la spécificité des lectines de type C envers les oses (figure 3.10).

3.3.2. Le récepteur du mannose (MR):

Le MR (CD206) est une lectine de type C appartenant au groupe VI. Il dispose de 8 domaines CTLDs (C-type lectin-like domain), un domaine de fibronectine type II, un domaine riche en cystéines et un court domaine cytoplasmique. Une forme soluble de MR est parfois présente dans le sérum et résulte de l'activité protéolytique des MRs fixés à la surface. Les MRs sont largement présents à la surface des DCs, des macrophages et d'autres tissus, comme le tissu hépatique et l'endothélium lymphatique (Mckenzie *et al.* 2007, Taylor *et al.* 2005). Le MR est en réalité une protéine transmembranaire, même si la majorité est localisée dans le compartiment intracellulaire dans les voies endocytique.

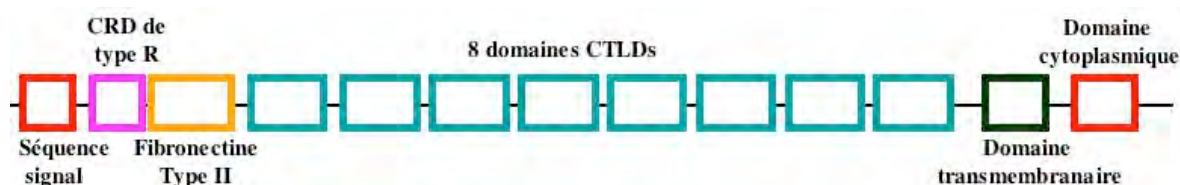


Figure.3.13: Représentation schématique de l'organisation des domaines des MRs. Les MRs disposent d'une séquence signal, d'un CRD de type R, un domaine de fibronectine II, de huit domaines CTLDs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique.

Une variété de ligands endogènes et exogènes a été décrite pour les différents domaines de MRs en plus de la reconnaissance Ca^{2+} -dépendante des carbohydrates. Cette activité est médiée par les CTLDs 4-8 du récepteur qui lie des mannoses terminaux, fucose ou N-acétyl glucosamine et est responsable de la reconnaissance des microbes (Taylor *et al.* 2005). En effet, il est impliqué dans la prise en charge de *Candida albicans*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Trypanosoma cruzi* et *Plasmodium yoeli* (Taylor *et al.* 1993). Certaines protéines endogènes solubles comme les enzymes lysosomiales et les activateurs plasmonigènes du tissu, qui disposent d'une séquence osidique « high-Mannose », sont éliminés de la circulation par les MRs (Stahl *et al.* 1980, Otter *et al.* 1991). La capacité des MRs à médier l'endocytose des protéines solubles suggère que ces récepteurs jouent un rôle dans la prise en charge rapide de l'antigène et sa dégradation dans l'immunité adaptative, mais également dans la prise en charge direct du pathogène dans la réponse innée. Ainsi, les MRs se trouvent à l'interface entre l'immunité innée/adaptative d'une part et d'autre part initiant la réponse de l'immunité acquise. Les études qui ont démontré la présence des MRs sur les DCs et les macrophages favorisent l'hypothèse où les MRs jouent un rôle dans la dégradation des antigènes (Sallusto *et al.* 1995). Des indices indirects sont obtenus de l'implication du MR dans la dégradation des LAMs (lipoglycane Lipo-Arabino-Mannane). Le

LAM mycobactérien est présenté aux lymphocytes T en complexe avec le CD1b, une molécule CMH-like (Prigozy et *al.* 1997). Le LAM peut se lier aux MRs, et la prolifération des lymphocytes T dépendante de LAM est inhibée par le mannane, un autre ligand du récepteur. Ces résultats suggèrent que les MRs sont responsables du transport du LAM dans le milieu vésiculaire intracellulaire où il est chargé sur le CD1b. La présentation améliorée d'un fragment des glycoconjugués endocytés par les MRs peut aboutir à l'association du produit de dégradation au CMH classe II. Les antigènes peptidiques qui apparaissent à la surface des cellules présentatrices ne sont pas eux même liés par leurs parties osidiques. Les fonctions des MRs seraient ainsi de médier la prise en charge sélective des pathogènes en se basant sur leur étiquetage osidique spécifique. Les peptides résultant de la dégradation du pathogène et présentés via le CMH dérivent ainsi des signatures identifiées par les lectines impliquées dans la reconnaissance.

3.3.2.1. L'organisation spatiale:

L'organisation qui distingue les MRs des autres lectines de type C est qu'ils disposent de plus d'un seul domaine CRD au sein d'une même séquence polypeptidique (figure.3.14). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I avec un domaine extracellulaire comportant 8 domaines CRDs, et un domaine de fibronectine type II et un domaine N-terminal riche en cystéines (Taylor et *al.* 1990).

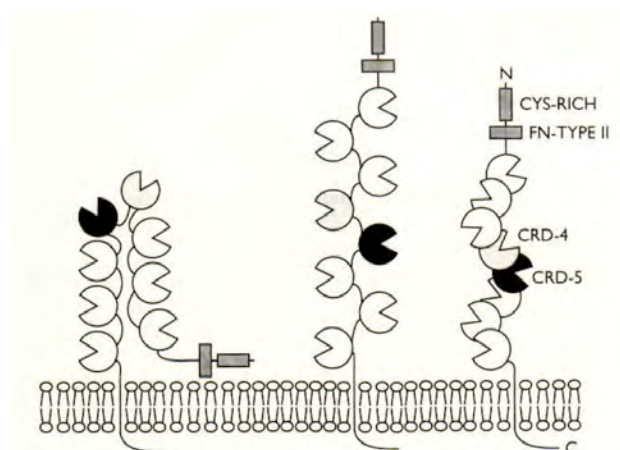


Figure.3.14 : L'organisation spatiale du récepteur de mannose. Des arrangements possibles des CRDs les uns par rapport aux autres sont représentés d'une façon schématique. Avec en N-terminal la présence d'un domaine riche en cystéine (CYS-RICH) et un domaine fibronectine de type II (FN-Type II) (image extraite de Weis et al. 1998).

Des expériences de délétion ont démontré que les CRDs de 4 à 8 sont nécessaires pour réaliser une interaction et pour endocyter les ligands naturels comme le mannane des levures

(Taylor et *al.* 1993). Les CRDs 4 et 5, qui forment un noyau protéique résistant aux protéases, suffisent pour interagir avec de ligands avec une grande affinité. En revanche, même si les CRDs 6, 7 et 8 participent à l'interaction, leur affinité pour le mananne est plus faible que celles des CRDs 4 et 5. (Taylor et *al.* 1993). Comme pour la collectine, l'interaction de haute affinité des MRs est réalisée à travers la forme en patch des CRDs qui, normalement sous forme individualisés, disposent d'une faible affinité pour les monosaccharides. Il est probable que la différence dans l'organisation du domaine entre les collectines et les MRs reflète leur spécificité pour différents ligands, avec des multiples CRDs différents dans une simple séquence polypeptidique. Ceci offre aux MRs la capacité de reconnaître une large gamme de différentes structures nécessaires pour fonctionner.

Les MRs reconnaissent les mêmes monosaccharides que les MBPs, et il y a sûrement des microstructures reconnues identiquement entre ces deux récepteurs. Néanmoins, les MRs devraient reconnaître au moins certains des sucres localisés à la surface des pathogènes, alors que les MBPs, dû à leur organisation, sont incapables de reconnaître les oligosaccharides « high-mannose » des mammifères et donc aucune fixation supplémentaire ne sera réalisée.

Récemment, trois autres récepteurs d'endocytose ont été identifiés et ont la même organisation que le MR, ce qui rend le MR un prototype pour cette nouvelle famille de récepteurs (Taylor et *al.* 1997). Un de ces récepteurs est le DEC-205, qui se trouve à la surface des cellules dendritiques et qui semble être capable de réaliser l'apprêtement des antigènes puisqu'un anticorps spécifique à DEC-205 est présenté au lymphocyte T alors que les anticorps non spécifiques à ce récepteur ne le sont pas (Jiang et *al.* 1995). L'analyse de séquence de DEC-205 prévoit que ces récepteurs ne reconnaissent pas les séquences osidiques (Taylor et *al.* 1997).

[3.3.2.2. L'information structurale:](#)

Même si les CRDs des MRs sont bien divergents des prototypes de la famille, chacun d'eux comporte des résidus conservés responsables du maintien structurale des CRDs. Ce n'est pas pour autant qu'il faut dire que le repliement des CRDs est identique partout. Chacun des CRDs dispose d'un certain nombre de résidus conservés comme celui qui est responsable de la fixation du Ca^{2+} et des sucres identiques à celles de la MBP et des E-sélectines. Ces résidus sont essentiellement conservés dans les CRDs 4 et 5. Une image détaillée de l'interaction de CRD 4 avec les sucres et le Ca^{2+} a été obtenue par l'analyse par d'interaction

ligand–protéine par RMN combinée avec des mutagenèses dirigées des résidus du site actif (Weis et *al.* 1996, Mullin et *al.* 1997). Certains aspects d'interaction du mannose et du Ca^{2+} avec le CRD4 du MR est similaire à celui de la MBP, contrairement aux autres, indiquant que l'interaction du mannose avec les MRs a évolué d'une façon divergente des autres membres de la famille des lectines de type C. Comme dans le CRD de la MBP, l'interaction majeure entre le CRD 4 et le sucre est réalisée par une interaction directe avec le Ca^{2+} . Néanmoins, le déplacement du pic dans le spectre RMN H1 en présence du GlcNAc ou du fucose suggère une interaction par recouvrement orbitalaire, dite stacking, avec la tyrosine contribuant à 25% de l'énergie libre de l'interaction du sucre. Ce type d'interaction par recouvrement orbitalaire est observé dans le cas d'une interaction entre le mannose ou le GlcNAc et les lectines des plantes, mais pas chez les MBPs.

En plus, un deuxième site de fixation du Ca^{2+} présent dans le CRD 4 (qui est différent du premier site des MBPs) présentent dans sa structure une différence dans la région de la boucle 1 et 2 par rapport à la même portion présente chez les MBPs (Mullin et *al.* 1997). Cette différence est peut-être due aux différentes positions de la boucle 4 (figure.3.8), contenant la tyrosine qui interagit avec le mannose, comme cette boucle participe à la fixation du Ca^{2+} dans le premier site de la MBP.

L'organisation spatiale des MRs est inhabituelle une fois comparée à d'autres protéines de surface. En effet, le fait d'avoir le CRD 4 et 5 en plein cœur de la chaîne polypeptidique plutôt qu'à l'extrémité semble avoir un rôle crucial dans l'interaction avec le ligand. Une explication de ce phénomène suggère que la partie extracellulaire des MRs est pliée afin d'obtenir une forme en U, plutôt qu'une forme linéaire sur la surface cellulaire. Cela va positionner le CRD 4 et 5 le plus loin de la surface cellulaire et le plus proches de leurs ligands.

Les CRDs sont séparés par une boucle de 10 à 25 acide aminés (Taylor et *al.* 1990). Chaque boucle comporte plusieurs prolines ce qui peut rendre l'organisation du domaine extracellulaire du MR plus étendue. Néanmoins, dans ce cas, les CRD 4 et 5 devraient être liés l'un à l'autre. En plus, le fait que le corps formé de CRD 4 et 5 soit résistant à la protéolyse suggère qu'il existe un contact physique très fort entre les deux.

Afin de bien comprendre comment le MR est capable de sélectionner les structures sucrées qui définissent les pathogènes, il est important de comprendre l'arrangement spatial du domaine à l'intérieur du polypeptide, et comment des domaines distincts interagissent avec le sucre. La structure du CRD 4 des MRs a été résolue par le groupe de Feinberg en 2000. Elle

s'est avérée très similaire à celle des autres membres de la lectine type C puisqu'il comporte 2 hélices α et 2 brins anti-parallèle β . La différence qui existe entre le CRD des MRs et celui des MBPs est que le premier dispose d'une hélice $\alpha 2$ plus déplacée vers l'extérieur. En fait, l'hélice $\alpha 2$ est la structure secondaire la plus variable au sein des CRD de la famille des lectines de types C (Ng et al. 1996).

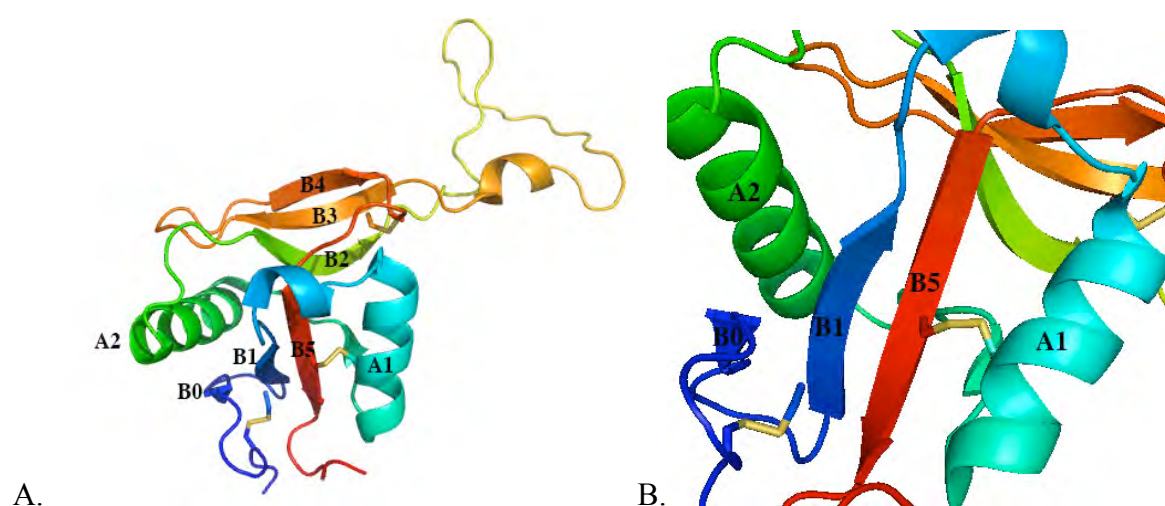


Figure.3.15: Structure du CRD4 du MR. (A) correspond à la structure du CRD 4 du MR avec les lettres A et B qui désignent respectivement les hélices α et les feuillets β présents. (B) un agrandissement de la partie basse de la structure où deux ponts disulfures sont observés (en orange) (PDB :1egg, Feinberg et al. 2000).

À la base de la molécule, les brins β du côté N et C terminal forme le feuillet β le plus bas de la structure, est également observé chez les MBPs (figure.3.15). Il existe un brin β antiparallèle, $\beta 0$, précédant le $\beta 1$. Ce brin est irrégulier et produit très peu de liaisons hydrogènes avec le $\beta 1$. Ce court feuillet β est stabilisé par un pont disulfure établi entre la boucle qui précède $\beta 0$ et une cystéine au sein de la chaîne $\beta 1$. Ce phénomène de stabilisation du feuillet à 3 brins anti-parallèles par un pont disulfure est observé également chez des nombreuses autres protéines disposant d'un domaine ressemblant aux lectines de type C, qui inclut la CD94 (Boyington et al. 1999) et la Ly49a (Tormo et al. 1999). En plus des structures résolues du CRD-2, -3, -6 et -8 des MRs ainsi que la lectine de type C hépatique des rats (RHL) comportent cette paire de cystéines, suggérant que ce domaine ait la même structure. Dans les CD94 (Boyington et al. 1999) et Ly49a (Tormo et al. 1999), cette région participe

dans l'interface des homodimères dans lequel $\beta 0$ provenant de chaque molécule s'apparie en feuillet β parallèle. Il est donc possible de penser que les CRDs des MRs peuvent s'apparier.

3.3.3. La famille des sélectines :

3.3.3.1. Sélectines dans le trafic des lymphocytes:

Les interactions entre les leucocytes et le système vasculaire sont réalisées en plusieurs étapes où les leucocytes vont tout d'abord rouler le long de la surface vasculaire à une vitesse réduite avant que l'adhésion ne devienne forte, induisant ainsi le mécanisme d'extravasation (Lasky et *al.* 1995). Cette séquence d'interaction est importante pour deux processus de migration distincts : migration des lymphocytes sur le côté apical des endothéliums des ganglions lymphatiques et la transmigration des neutrophiles et des monocytes jusqu'aux sites d'inflammation (figure.3.16).

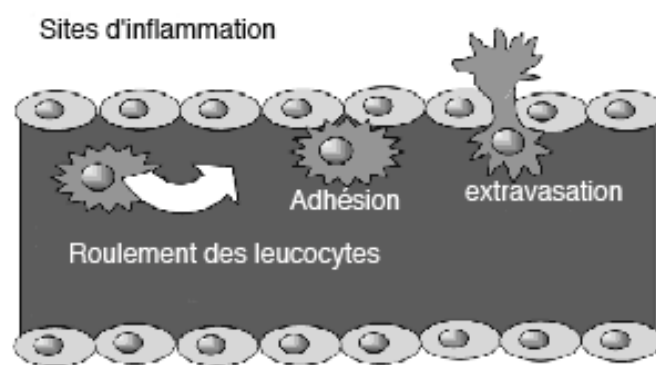


Figure.3.16: Les différentes étapes dans la migration des lymphocytes

La première étape de ce processus, où les contacts répétitifs et réversibles sont réalisés à travers des interactions de type protéine-sucre, alors que les interactions solides sont réalisées par des interactions de type protéine-protéine. Dans le cas d'un lymphocyte qui retourne vers les ganglions lymphatiques, les interactions sont réalisées entre les L-sélectines (L pour leukocyte) présents à la surface des lymphocytes d'une part, et les structures osidiques présents à la surface des endothéliums d'autre part. L'arrangement est inversé au niveau du site d'inflammation, où la E- et la P-sélectine (E pour endothélium et P pour plaquette) sont exprimées au niveau de l'épithélium et interagissent avec les structures osidiques présents à la surface des leucocytes circulants.

3.3.3.2. L'organisation des sélectines:

Les trois sélectines partagent une organisation similaire des domaines (Lasky et *al.* 1995). Chacune est une lectine transmembranaire de type I avec un CRD en N-terminal adjacent à un domaine ressemblant à celui de l'EGF (Epithelial growth Factor). Ces paires de modules sont après ancrées à la membrane via une série des petites séquences répétées ou des répétitions chargées du contrôle du complément, appelées aussi domaines sushi. Dans ces protéines humaines, il existe deux de ces modules dans la L-sélectine, E-sélectine, et neuf dans la P-sélectine. Des mutations dirigées au niveau de ces différents domaines ont conduit à des observations avec des conclusions contradictoires. Néanmoins, il est démontré que le CRD est essentiel pour la liaison avec les carbohydrates d'une façon Ca^{2+} dépendante. Il existe quelques données qui démontrent que le domaine « EGF-like » ainsi que les motifs répétés « Sushi » sont capables d'influencer l'interaction avec le sucre. Néanmoins le mécanisme derrière cette influence est toujours en cours d'étude (figure.3.17).

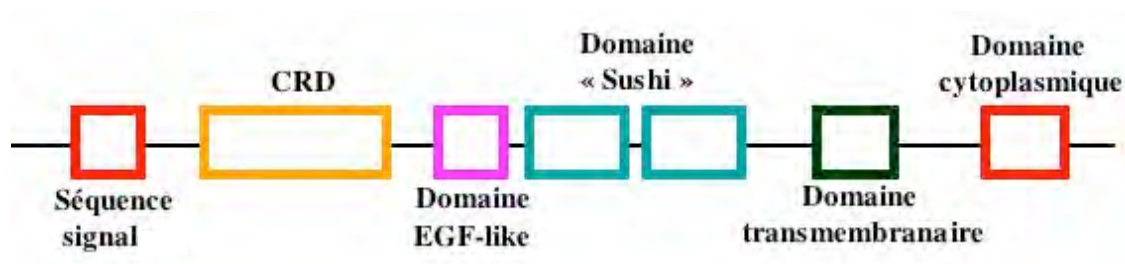


Figure.3.17: Représentation schématique de l'organisation des domaines des sélectines. Les sélectines disposent d'une séquence signal, d'un CRD, d'un domaine « EGF-like », de deux domaine « Sushi », d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique.

3.3.3.3. Les ligands des sélectines :

Les ligands physiologiques des sélectines sont le sujet de nombreuses études (Lasky et *al.* 1995, Kansas et *al.* 1996). Il est évident que cette sélectine dispose d'une affinité pour des structures osidiques communes mais la spécificité pour chacune est différente (Rosen et *al.* 1994). En général, les ligands naturels sont normalement des sucres liés à leurs protéines ou à leurs lipides par une liaison O-glycosidique. Ces ligands contiennent des trisacharides fucosylés comme le Lewis X (Le^x), Lewis a (Le^a) ou des composés proches de ces structures (fig.3.18). Dans tous les cas, l'addition des charges négatives, par l'attachement d'un groupe

sulfate ou d'acide sialique, est importante. Un des ligands les plus adaptés pour la L-sélectine est le 3'-sialyl-Lewis^x (sLe^x) avec des groupes sulfates supplémentaires attachés à des unités osidiques comme le N-acétylglucosamine et le galactose (Rosen et *al.* 1996). À l'opposé, le meilleur ligand identifié pour les P-sélectines, PSGL-1, contient des sLe^x désulfatés. Ces données démontrent l'importance de la présence de sulfo-tyrosines proches du site de glycosylation de la protéine dans la reconnaissance des charges négatives (figure.3.18).

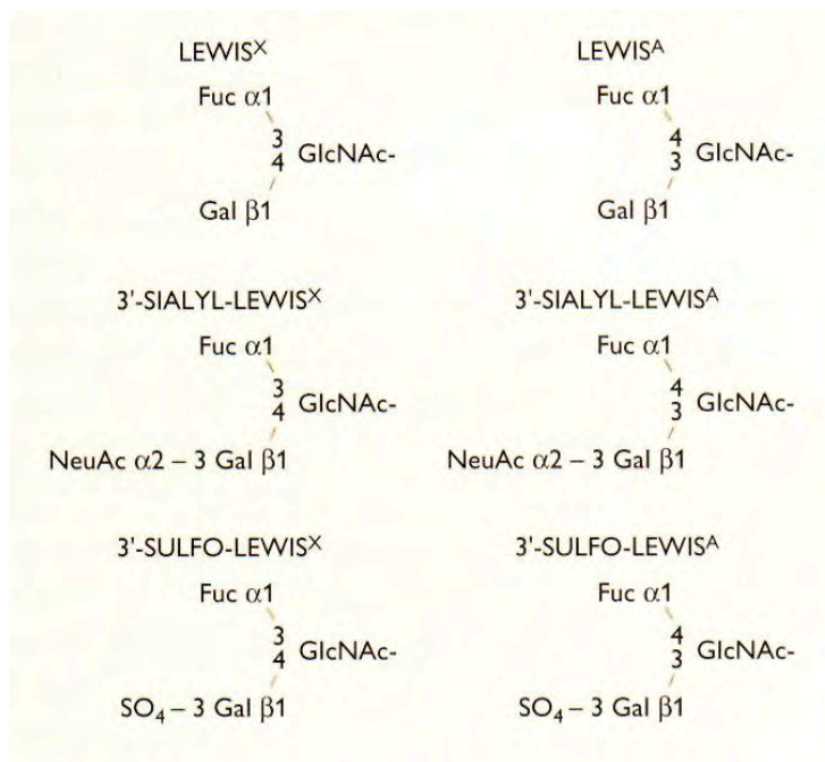


Figure.3.18: séquences des oligosaccharides reconnues par les sélectines.

3.3.3.4. L'analyse structure –fonction des sélectines:

La structure des fragments amino-terminaux de la E-sélectine humain, comportant le CRD et le domaine EGF-like, a été analysée en absence de ligand (Graves et al. 1994). Comme attendue, la forme générale du CRD ressemble à celui de la MBP (figure.3.19 (A)). La différence majeure est que la région qui correspond au site 1 du Ca²⁺ chez la MBP n'existe pas chez les sélectines (figure.3.19 (A)). D'autres régions ont une différence importante concernant les boucles situées entre l'α1 et le β2, et entre le β3 et le β4. En plus la boucle L4 de la MBP, qui fournit les ligands pour les deux Ca²⁺ dans la structure, est très

différente de celles des sélectines (figure.3.19 (A)), avec le Glu88, l'équivalent de Glu193 de la MBP-A, qui est poussé à la périphérie du site (figure.3.19 (B)).

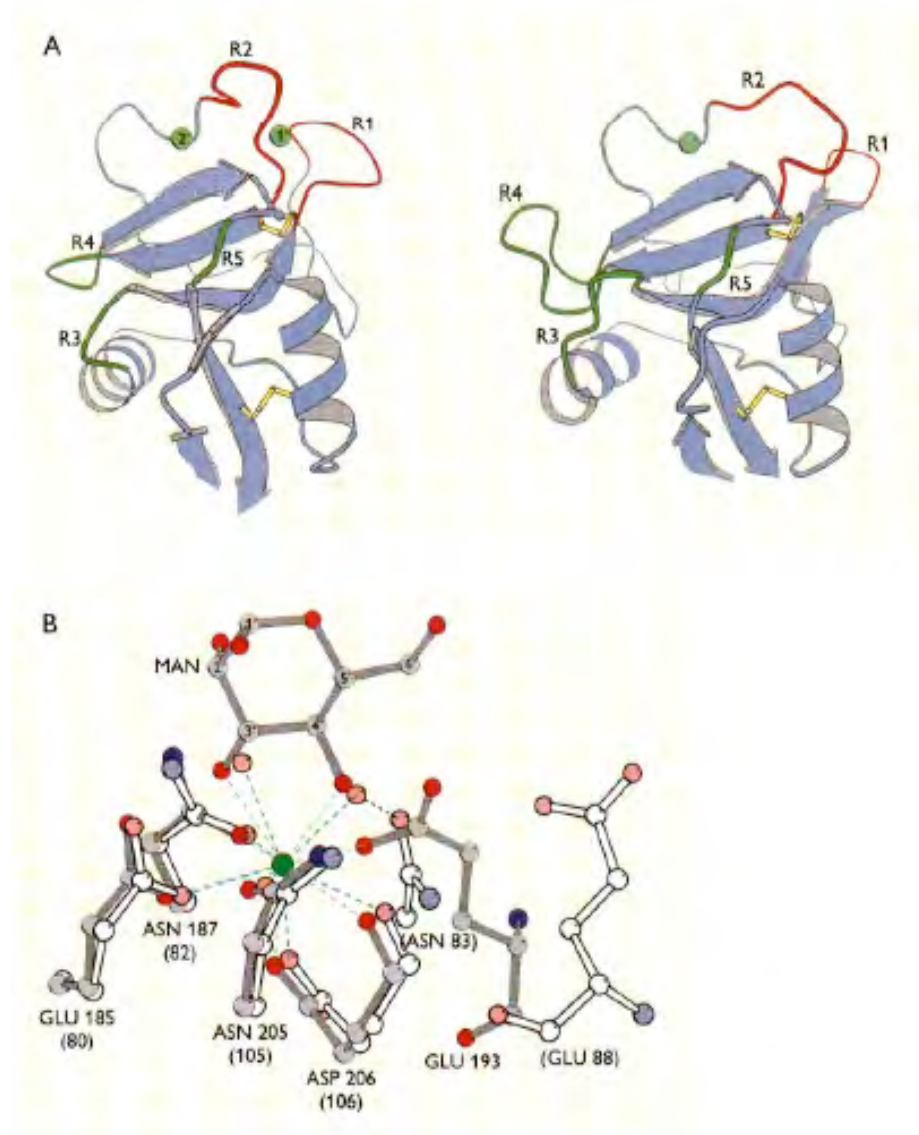


Figure.3.19 A: Comparaison du CRD de la MBP-A (à gauche) avec la E-selectine à droite. Les séquences qui démontrent des différences majeures sont les zones R1et R5 (Blanck et *al.* 1996, Torgersen et *al.* 1998). Les régions R1 et R2 qui forment le site 1 du calcium dans la MBP-A sont en rouges, et les R3, R4 et R5 sont présentées en vert.**Figure.3.19 B : Comparaison du site calcium conservé entre le MBP (en gris) et le E-sélectine (en blanc):** les atomes d'oxygène sont présentés en rouge, l'azote en bleu et le calcium en vert (les deux images sont extraites de Weis et *al.* 1999).

3.3.4. La famille de DC-SIGN:

DC-SIGN est une lectine de type C agissant comme récepteurs à de nombreux pathogènes. Cette famille comporte DC-SIGN, DC-SIGN R et L. Cette famille et plus particulièrement la lectine DC-SIGN sera développée dans le chapitre suivant.

3.4. La multimérisation des lectines types C:

La défense contre les agents pathogènes est basée sur la capacité du système immunitaire inné à reconnaître des motifs structuraux conservés spécifiques des microorganismes. Ces structures hautement conservées sont appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Ces PAMPs incluent des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, les peptidoglycanes des bactéries à gram positif et les polysaccharides au niveau des surfaces fongiques. La capacité des lectines de type C à reconnaître les microorganismes est dépendante de la densité de PAMPs présents à leurs surfaces d'une part et du degré de multimérisation des lectines d'autre part. En réalité, l'arrangement des CRDs en multimère permet de projeter les sites de reconnaissance dans une seule direction et d'augmenter l'interaction avec les structures osidiques présents sur la surface cible. Ainsi, plusieurs CRDs (dont chacun individuellement possède une faible affinité pour une unité osidique) sont regroupés sur la même protéine pour atteindre une haute affinité vis-à-vis les oligosaccharides des pathogènes. Le mécanisme d'assemblage des molécules ayant une faible affinité pour un ligand en une macromolécule de forte affinité est désigné par l'avidité. Ceci est observé chez les lectines de type C solubles et membranaires.

Les collectines solubles forment un trimère qui peut encore s'assembler en degré d'oligomérisation supérieur. Dans le cas d'une mutation qui empêche l'oligomérisation des MBPs, une réduction dans l'activation du système du complément sera engendrée, induisant ainsi des états d'infections sévères et même des maladies auto-immunes.

Les lectines de type C membranaires ont également élaboré une stratégie pour augmenter la force de l'interaction avec les PAMPs. Le domaine extracellulaire des MRs est composé de plusieurs CRDs, parmi lesquels déjà trois sont capables d'établir une interaction avec haute affinité et d'endocyter des glycoconjugués multivalents.

Dans le cas de DC-SIGN, une lectine de type C membranaire, l'avidité est réalisée à deux niveaux différents. Tout d'abord, DC-SIGN s'organise en tétramère, disposant ainsi 4 têtes CRDs, suffisant pour réaliser une interaction multivalente et de haute affinité avec les

séquences mannosylés des pathogènes. Ensuite les tétramères de DC-SIGN se regroupent en patch au niveau des rafts lipidiques de la surface des cellules dendritiques. Au cours de la maturation des DCs, la distribution de DC-SIGN passe d'une localisation aléatoire et homogène sur toute la surface cellulaire à une organisation en micro-domaines cellulaires. Ces microdomaines ont un diamètre de 100 à 200nm (Cambi et *al.* 2004). Cette organisation en micro-domaines est importante pour l'interaction, la prise en charge et l'internalisation des particules virales, suggérant ainsi que cet assemblage multimoléculaire de DC-SIGN à la surface cellulaire agisse comme une plate-forme de fixation privilégié des pathogènes (figure.3.20).

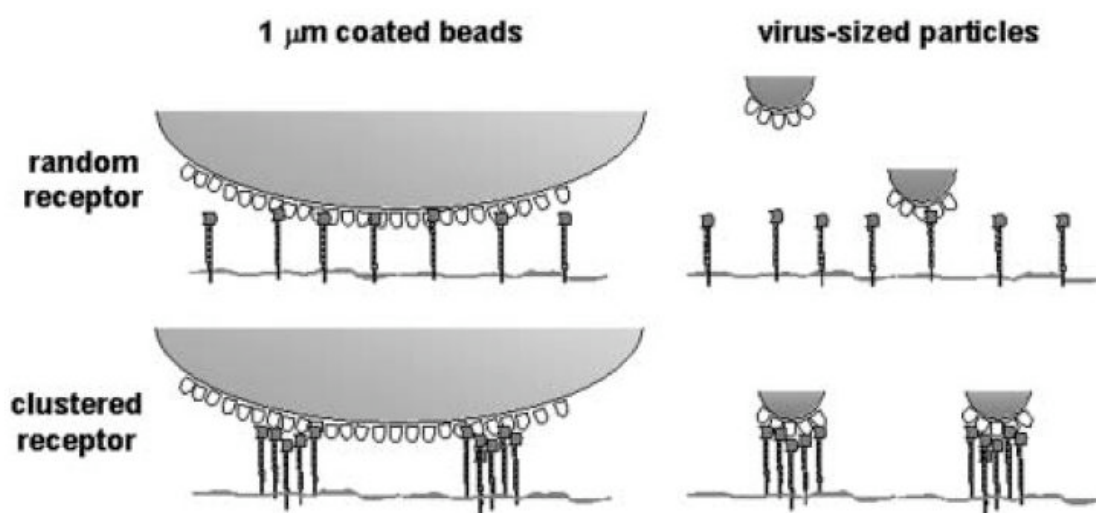


Figure.3.20: Représentation schématique de l'impact de l'interaction d'une bille ou d'un virus avec des récepteurs distribués soit d'une façon homogène ou regroupée en patch sur la surface cellulaire. L'interaction d'une bille de 1µm ou d'un virus avec des récepteurs non regroupés est faible. Le regroupement des récepteurs, en occurrence DC-SIGN, sur la surface cellulaire augmentera le nombre de récepteurs interagissant avec le même ligand (virus ou bille) induisant ainsi une interaction multivalente de forte affinité (Figure extraite de Cambi et *al.* 2004).

[3.5. La spécificité des lectines via les séquences glycosidique des ligands:](#)

Des études récentes ont démontré que les lectines de type C sont sensible à la moindre différence dans l'arrangement et la ramification des résidus osidiques au sein d'une séquence glycosidique donnée. Par exemple, la MBP reconnaît les structures disposant d'une seule unité mannose à l'extrémité de la séquence, alors que DC-SIGN reconnaît les séquences disposant des unités mannoses associées de façon spécifique appelées séquences «High-mannose».

Malgré le fait que les CRDs des lectines de type C reconnaissent les structures contenant du mannose, l'ordre dans l'arrangement, le degré de branchement et l'espacement entre ces différentes unités sucrées dictent un profil de reconnaissance spécifique à chaque récepteur. Un bon exemple de cette reconnaissance spécifique est celle des Lewis du groupe sanguin modifiés qui est reconnue par des lectines de type C distinctes :

En réalité, DC-SIGN reconnaît les deux séquences non sialysés de Lewis-X et de Lewis-A, alors que les P- et E-sélectines disposent d'une haute affinité pour les séquences sialysés de Lewis-X et de Lewis-A (Rosen et *al.* 1996, Koppel et *al.* 2005). Les E- et L-sélectines interagissent avec la forme sulfatée de Lewis-X et de Lewis-A alors que DC-SIGN reconnaît avec une très grande affinité la séquence Lewis-A sulfaté et pas de tout le Lewis-X sulfaté (Rosen et *al.* 1996, Koppel et *al.* 2005).

Ainsi l'existence de ce spectre de reconnaissance spécifique des séquences osidiques par une lectine donnée a encouragé le développement des techniques de synthèse chimiques des unités osidique afin de développer des thérapies antivirales adaptées. Ces molécules synthétisées devront ainsi cibler spécifiquement un récepteur qui est à l'origine des maladies. La partie qui traite la synthèse des antiviraux sera développée ultérieurement dans un chapitre qui lui est consacré.

3.6. La prise en charges des antigènes par les lectines types C:

Les lectines de type C sont responsables de la capture et de l'internalisation des pathogènes. Ceci conduit à une élimination directe dans le cas des macrophages.

Dans le cas de DCs, suite à une dégradation lysosomale des pathogènes internalisé, des fragments d'antigènes vont être produit et seront chargés sur les molécules du CMH II. Ces molécules du CMH II, chargées de leurs peptides antigènes, vont les présenter aux lymphocytes T et déclencheront une réponse du système immunitaire acquis (figure.3.20).

Les voies d'internalisation et d'adressage intracellulaire sont différentes selon les familles de lectines de type C. En effet, le MR délivre l'antigène capturé aux endosomes précoces avant d'être recyclé en surface alors que DC-SIGN entraîne l'antigène jusqu'aux endosomes tardifs et il n'y a aucune donnée qui indique que DC-SIGN soit recyclé en surface (Weis et *al.* 1998).

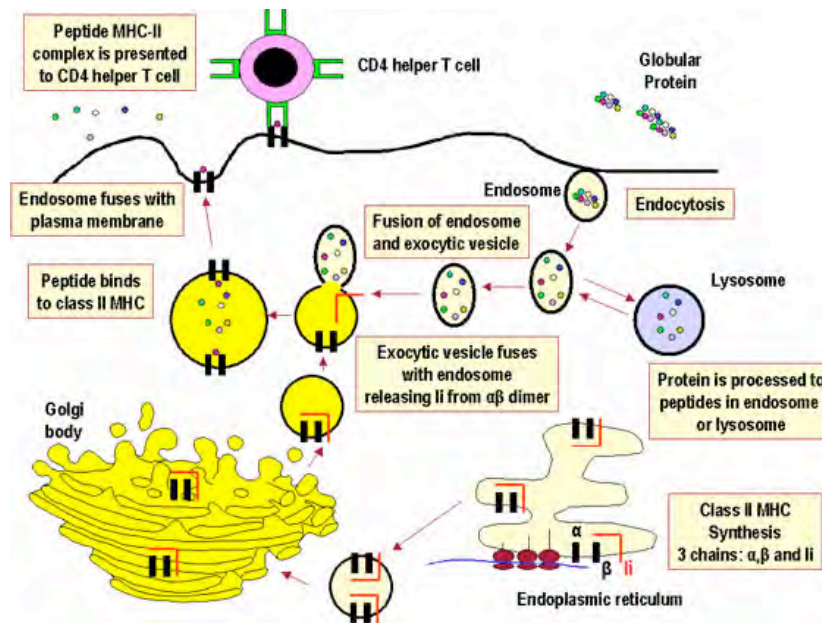


Figure.3.21: Schéma présentant l'internalisation d'un ligand et son apprêtement dans la cellule présentatrice d'antigène. La protéine ligand internalisée est digérée dans l'endosome ou le lysosome. Suite à cela, les peptides résultant de cette digestion sont apprêtés au CMH II au niveau des vésicules de sécrétion. Le CMH II chargé de son peptide émerge à la surface et présente son chargement à des Lymphocytes T CD4+ (pathmicro.med.sc.edu/bowers/fig2-mhc2.jpg).

CHAPITRE 4 : La lectine DC-SIGN

4.1. Introduction:

Les DCs sont connues comme les cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes. Elles n'initient pas uniquement la réponse immunitaire primaire, mais l'inhibent également (Banchereau et *al.* 2000). Les DCs jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Les DCs peuvent être un des facteurs déclenchant des maladies auto-immunes, et jouent un rôle important dans un mécanisme de contournement du système immunitaire (certains pathogènes et tumeurs). Il a été démontré que le rôle attribué aux DCs dans l'immuno-régulation est étroitement associé à ces capacités de reconnaissance et de régulation de taux d'expression des récepteurs à la surface des DCs. Parmi ces récepteurs, la famille des CLR (C-type Lectin Receptors) et les TLRs (Toll-Like Receptors) a été largement étudiée.

Étant un membre de la famille des CLR, DC-SIGN joue un rôle dans l'immuno-régulation. Celui-ci est connue sous l'appellation CD209. Elle a été identifiée comme un récepteur spécifique du VIH en 2000 (Geijtenbeek et *al.* 2000a). En effet, DC-SIGN s'est montrée capable d'interagir avec la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120, et d'améliorer l'infection des lymphocytes T CD4⁺ par les DCs favorisant le mécanisme infectieux (Geijtenbeek et *al.* 2000a, Geijtenbeek et *al.* 2000b). Comme cette lectine est également capable d'interagir avec l'ICAM-3 sur la surface des Lymphocytes T sans utiliser les intégrines, mais en utilisant le calcium, elle a été nommée DC-SIGN (pour Dendritic cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-intergrin).

En plus de sa capacité à agir comme un récepteur, DC-SIGN s'est avérée capable de jouer un rôle important dans la migration et l'adhésion de DCs, la réponse inflammatoire, l'activation des LTs, l'initiation d'une réponse immune et le contournement du système immunitaire par certains pathogènes et tumeurs. En plus, DC-SIGN s'est avérée capable de réguler la réponse adaptative et innée (Geijtenbeek et *al.* 2000a, Geijtenbeek et *al.* 2000b).

Afin d'avoir un rôle physiologique, DC-SIGN devrait interagir de façon spécifique avec des motifs oligosaccharidiques riches en mannoses présents au niveau des ligands endogènes humains tels que l'ICAM-2 et ICAM-3 (Geijtenbeek et *al.* 2000b, Bashirova et *al.* 2003). Après la découverte de DC-SIGN en tant que récepteur de gp120 de l'enveloppe virale du

VIH, des études ont démontré sa capacité à interagir avec les glycoprotéines de l'enveloppe du cytomégalovirus (CMV) ainsi que du virus de l'hépatite C (VHC), d'Ebola, de la Dengue (Bleijs et *al.* 2001, Turville et *al.* 2003, Mcever et *al.* 2001). Il a été également mis en évidence la capacité de DC-SIGN à interagir également avec des pathogènes non-viraux tel qu'*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida Albicans* (Liu et *al.* 2002).

Pathogen	Disease
HIV	Acquired Immunol. Deficiency Syndrome
Ebola Virus	Hemorrhagic Fever
Cytomegalovirus	Herpès
Hepatitis C Virus	Hepatitis C
Dengue Virus	Hemorrhagic Fever
<i>H. pylori</i> (bacteria)	Stomac Ulcer
<i>K. pneumoniae</i> (bacteria)	Pneumonia
<i>M. tuberculosis</i> (bacteria)	Tuberculosis
<i>C. albicans</i> (yeast)	Candidose
<i>L. pifanoi</i> (parasite)	Leishmaniose
<i>S. mansoni</i> (parasite)	Bilharziose

Tableau.4.1: Liste des pathogènes reconnus par DC-SIGN et les maladies qui leur sont associés.

4.2. Structure de DC-SIGN:

Le gène codant pour DC-SIGN (CD209) est de 13kb. Il comporte 7 exons et 6 introns (Figure.4.2), est localisé dans le chromosome humain 19p13.2-3 (Mummidi et *al.* 2001). Il est localisé à proximité d'autres gènes codant pour des lectines de type C comme le CD23 et le gène codant pour DC-SIGN R, un homologue de DC-SIGN (Bashirova et *al.* 2003).

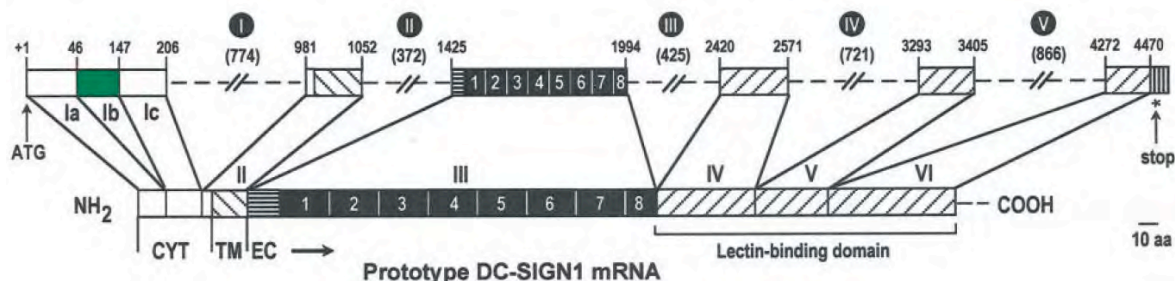


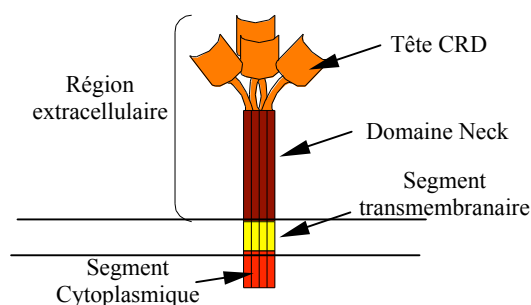
Figure.4.2: Schéma représentant l'organisation du gène de DC-SIGN et de son transcrit. On représente dans ce gène les introns (en pointillé) et les exons (en carré rayé, noir et vert) (image extraite de Mummidi et *al.* 2001).

DC-SIGN est une lectine membranaire de type II de 44kDa comportant 404 acides. L'organisation des domaines au niveau de cette lectine est présentée dans la figure.4.3.

A.



B.



C.

SIGN	MSDSKEPRLQQLGLLEEEQL-----RGLGFRQTRGYKSLAGCLGHGPLVLQLLSFTL	10	20	30	40	50
SIGNR	MSDSKEPRVQQLGLLEEDFTTSGIRLFPRDFQFQIHHGKSSGTCLGHGALVLQLLSFML	10	20	30	40	50
SIGN	LAG----LLVQVSKVPSISQEQSRQDAIYONLTOLKAAVGESEKSKLQEIYQELTOLK	60	70	80	90	100
SIGNR	LAGVLVAILVQVSKVPSLSQEQSEQDAIYONLTOLKAAVGESEKSKLQEIYQELTOLK	60	70	80	90	100
SIGN	AAVGELPEKSKLQEIYQELTRLKAAVGESEKSKLQEIYQELTWLKAAGELPEKSKMQE	110	120	130	140	150
SIGNR	AAVGELPEKSKLQEIYQELTRLKAAVGESEKSKLQEIYQELTRLKAAVGESEKSKLQE	110	120	130	140	150
SIGN	IYQELTRLKAAVGESEKSKQEIYQELTRLKAAVGESEKSKQEIYQELTRLKAAVGE	170	180	190	200	210
SIGNR	IYQELTRLKAAVGESEKSKLQEIYQELTELKAAVGESEKSKLQEIYQELTOLKAAVGE	170	180	190	200	210
SIGN	LPEKSKQEIYQELTOLKAAVERICHPCPWENTFFQGNCFMSNSQRNWHDSITACKEVG	230	240	250	260	270
SIGNR	LPDQSKQEIYQELTDLKTAFERLCRHCPKDWTFQGNCFMSNSQRNWHDSVTACQEV	230	240	250	260	270
SIGN	AQLVVIKSAEEQNFLQLQSSRSNRFTWMGLSDLNQEGTWQWVDGSPPLSPKQYWNRGEP	290	300	310	320	330
SIGNR	AQLVVIKTAEEQNFLQLQTSRSNRFSWMGLSDLNQEGTWQWVDGSPSPFQRYWNSGEP	290	300	310	320	330
SIGN	NNVGEECAEFSGNGWDDKCNLAKFWICKKSAASCSRDE	350	360	370	380	
SIGNR	NNSGNEDCAEFSGNGWDDNRCVDNYWICKKPAACFRDE	350	360	370	380	

Figure.4.3: Présentation schématique de l'organisation des domaines de DC-SIGN/R et leur alignement des séquences. (A) DC-SIGN/R dispose un segment cytoplasmique (en rouge), un segment transmembranaire (en jaune), une région Neck disposant de 7,5 motifs répétés de 23 acides aminés (en marron) et un domaine de reconnaissance de sucre CRD (en vert). (B) Alignement des séquences de DC-SIGN avec DC-SIGNR avec le logiciel LALIGN (ExPASy), la zone en marron représente la région neck (identité de séquence 92,5%), la zone en orange représente le domaine CRD (identité de séquence de 80,1%).

En effet, DC-SIGN comporte un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Le domaine extracellulaire est subdivisé en un domaine de reconnaissance de sucre (CRD) et le domaine Neck (figure.4.3). DC-SIGN R est une lectine exprimée au niveau des sinus hépatiques et de l'endothélium. Elle dispose de 77% d'identités de séquence avec DC-SIGN et partage la même organisation des domaines (Snyder et *al.* 2005).

Le CRD de DC-SIGN dispose d'une structure globulaire et inclut dans sa structure 2 hélices α , 12 feuillets β , et 3 ponts disulfures (figure.4.4). Une boucle (loop) dépasse de la surface de la protéine et participe à la formation des 2 sites de fixation au Ca^{2+} . Le premier site est responsable du maintien de la structure du CRD et le second est responsable de l'interaction avec les structures glycosylées (Feinberg et *al.* 2001). Quatre acides aminés (Glu347, Asn349, Glu354 et Asn365) interagissent avec le Ca^{2+} dans le site et dictent la reconnaissance spécifique des structures sucrées. Le domaine CRD est le domaine qui comporte le plus des séquences conservées avec les autres lectines de type C.

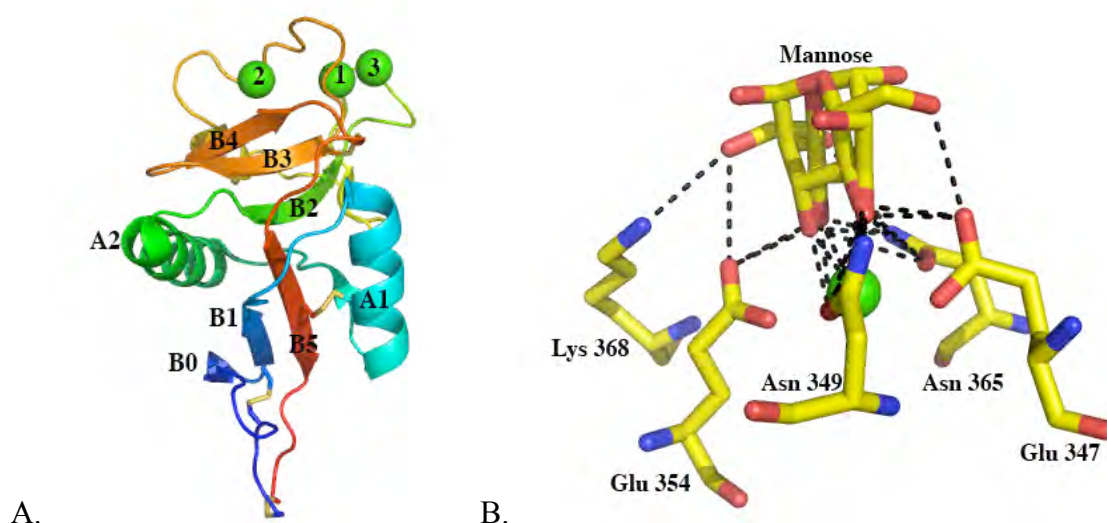


Figure.4.4: Présentation de la structure cristallographique du CRD de DC-SIGN et de son site actif fixant le mannose. (A) Les lettres A et B représentent respectivement les hélices α et les feuillets β , les 3 ponts disulfures sont présentés en traits de couleur orange; (B) Les acides aminés Glu347, Asn349, Glu354 et Asn365 du site actif de DC-SIGN CRD. Une des deux conformation de Mannose interagit également avec la Lys 368 (PDB :1k9i, Feinberg et *al.* 2001).

Le domaine Neck est formé de sept séquences répétées et une huitième incomplète. Chacune des séquences comporte 23 acides aminés. La première moitié de chacun de ces motifs répétés contient des résidus hydrophobes, espacés par intervalles réguliers, ce qui est observé dans la majorité des protéines coiled-coil (McLachlan et *al.* 1975, Stetefeld et *al.*

2000). En réalité, la présence d'hélices détectées par dichroïsme circulaire soutient l'idée d'un tétramère avec des motifs coiled-coil (Mitchell et *al.* 2001). Cette région Neck est essentielle pour la tétramérisation de la lectine (Feinberg et *al.* 2005, Mitchell et *al.* 2001) (figure.4.5).

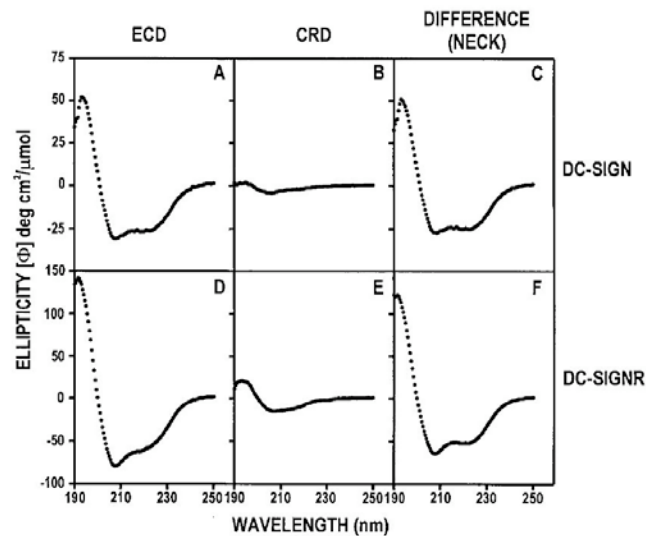


Figure.4.5: Le spectre de Dichroïsme Circulaire du Neck de DC-SIGN/R obtenue par soustraction du spectre de CRD de celui du domaine extracellulaire (image extraite de Mitchell et *al.* 2001).

Le domaine transmembranaire permet d'insérer la protéine dans la membrane. Le domaine N-terminal est localisé dans la région cytoplasmique et comporte un motif d'internalisation, comme les deux motif di-leucine (LL), tri-acidique (EEE) et un domaine incomplet du motif d'activation des tyrosines des immunorécepteurs (ITAM). Le motif LL participe à l'internalisation de l'antigène et le motif EEE joue un rôle dans l'adressage vers l'endosome tardif/ Lysosome (Mahnke et *al.* 2000).

4.3. Localisation de DC-SIGN:

DC-SIGN est exclusivement exprimés par les cellules dendritiques interstitielles immatures et matures (Bleijis et *al.* 2001). Elle n'est pas exprimée sur les monocytes, les lymphocytes T, lymphocytes B, les thymocytes et les cellules de la moelle osseuse CD34+. Les cellules exprimant DC-SIGN sont présentes dans les régions des lymphocytes T des ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Dans la région cutanée, DC-SIGN est uniquement exprimés sur les cellules dendritiques du derme. En revanche, au niveau des cellules CD1a, dites de Langerhans, elle ne l'est pas. DC-SIGN est également exprimée sur des cellules «dendritic-like» présentes dans les muqueuses du rectum, de

l'utérus...(Geijtenbeek et *al.* 2000a). Une étude récente a démontré que DC-SIGN peut être exprimée à la surface des macrophages dans le tissu foetal (Turville et *al.* 2003).

4.4. Les fonctions de DC-SIGN:

4.4.1. Rôle de DC-SIGN dans la migration des cellules dendritiques:

La différenciation des DCs immatures en matures est réalisée par l'interaction de DC-SIGN avec l'ICAM-2 présent sur la surface des cellules endothéliales en présence de l'IL-8, MIP-1 et d'autres cytokines (Liu et *al.* 2002). Après cela, elles migrent des vaisseaux sanguins jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où elles initient la réponse immunitaire (Liu et *al.* 2002). L'ICAM-2 est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales et son interaction avec DC-SIGN peut résister aux forces de friction causées par le flux sanguin. En effet, c'est la glycosylation de l'ICAM-2 qui est reconnue par DC-SIGN. DC-SIGN et les sélectines interagissent avec les structures sucrées de la surface de l'endothélium. D'autres CPA du sang peuvent être également recrutées par les chimiokines et les molécules d'adhésion. Sélectine-DC-SIGN-ICAM-2 et des chimiokines peuvent activer des intégrines, comme la LFA-1, qui recrutent la DC et induit l'adhésion. Durant ce temps, l'induction de l'expression de l'ICAM-1 par les médiateurs d'inflammation peuvent renforcer cette adhésion via l'interaction LFA-1-ICAM-1. Les études ont démontré que les interactions entre DC-SIGN-ICAM-2 et LFA-1-ICAM-1 sont demandées pour réaliser la migration trans-endothéliale des DCs. Parmi ces interactions, il s'est avéré que l'interaction DC-SIGN-ICAM-2 induit les premières adhésions des DCs à court terme et est réversible, par contre, l'interaction LFA-1-ICAM-1 permet une migration trans-endothéliale des DCs et dure plus longtemps (Van Gisbergen et *al.* 2005). Les chimiokines locales ne vont attirer que les DCs qui expriment les récepteurs correspondant mais également DC-SIGN permettant à la DC de migrer et de réaliser ses fonctions immunologiques. Ainsi les DCs DC-SIGN+ pourrait participer à l'inflammation locale (Geijtenbeek et *al.* 2000a, Bleijs et *al.* 2001).

4.4.2. Rôle de DC-SIGN dans la transduction du signal intracellulaire:

Cappros et *al.* ont démontré que l'engagement de DC-SIGN avec des anticorps spécifiques ne permet pas une induction de la maturation des DCs mais induit la phosphorylation de ERK 1/2 (Extracellular Signal-Regulated kinases) et de l'akt (une sérine-thréonine kinase) sans une activation concomitante de p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Capparos et *al.* 2006). La p38 MAPK est impliquée dans la réponse

cellulaire à un stress ou aux cytokines. DC-SIGN, ayant interagi avec un ligand, induit également la phosphorylation de PLC α (phospholipase C de type α) stimulant l'augmentation de la concentration de calcium dans les cellules dendritiques. Ces résultats permettent de suggérer que DC-SIGN induit des signaux intracellulaires (comme ERK1/2, la tyrosine kinase Lyn et syk etc.) modulant ainsi la maturation des cellules dendritiques et jouant un rôle dans l'inflammation.

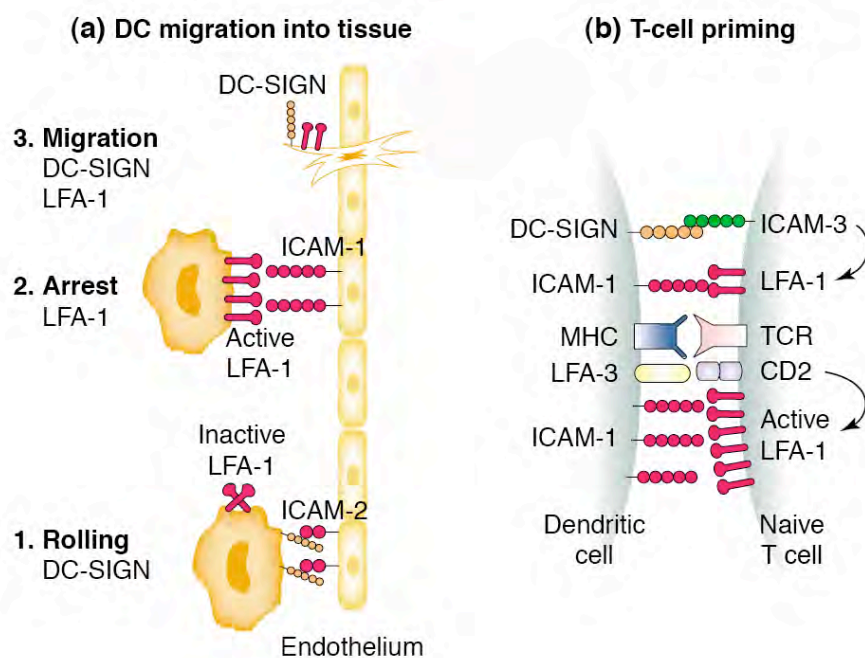


Figure.4.6: Présentation schématique de la migration des DCs et la synapse immunologique formé entre une DC et un Lymphocyte T. (A) L'interaction faible de DC-SIGN avec ICAM-2 permet le déplacement d'une DC le long de l'endothélium, l'interaction forte de LFA-1 de la DC avec l'ICAM-1 de l'endothélium fige le déplacement de la DC afin qu'elle puisse enfin traverser l'endothélium. (B) la synapse immunologique qui présente des interactions entre DC-SIGN, ICAM-1 de DC avec l'ICAM-3 et le LFA-1 du lymphocyte T. une fois le CMH va donner son antigène au TCR, le lymphocyte T sera activé et stabilisera la synapse immunologique en surexprimant LFA-1 à surface (image extraite de Bleijis et *al.* 2001).

4.4.3. Rôle de DC-SIGN dans la synapse immunologique:

Après migration jusqu'au tissu lymphoïde, les DCs peuvent induire une réponse immune primaire. Une fois dans les ganglions lymphatiques, les DCs présentent leurs antigènes sous forme d'un complexe CMH II-peptide aux Lymphocytes T (LT) (Liu et *al.* 2002, Van Gisbergen et *al.* 2005). L'activation complète des LTs est réalisée par la présence des molécules de co-stimulation présentes à la surface des DCs.

L'organisation d'un site de contact immunologique entre le LT et la DC joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire (figure.4.6). Le complexe TCR-CMH,

ensemble avec l'interaction CD2-LFA-3, se trouve localisé au centre de la synapse immunologique. Alors que le LFA-1 en interaction avec l'ICAM-1 forme l'anneau périphérique de la synapse (Dustin et *al.* 1989, Dustin et *al.* 1998). La position de DC-SIGN au sein de la synapse immunologique n'est pas encore déterminée. Ce qui est solidement démontré est que l'interaction DC-SIGN-ICAM-3 permet l'interaction de DCs avec la surface des LTs (figure.4.6). Suite à cette interaction, les LFA-1 des LTs sont activés et stabilisent ensuite la jonction immunologique due à la grande avidité de l'interaction de LFA-1-ICAM-1 et CD2-LFA-3 (Bleijs et *al.* 2001).

4.4.4. Rôle de DC-SIGN dans l'induction d'une réponse immunitaire:

Les DCs peuvent activer les LTs dans les ganglions lymphatiques mais le mécanisme est faiblement compris. Des études récentes démontrent que l'interaction de DC-SIGN des DCs avec les deux molécules CEACAM1 (pour Cancerino-Embryonic Antigen-related Cell Adhesion molecule-1) et Mac1 (Macrophage-1 antigen) des neutrophiles sont requises pour établir un contact cellulaire entre eux. En effet, DC-SIGN reconnaît le Lewis X présent à la surface de CEACAM1 et Mac1. De tels interactions auraient pour effet de promouvoir la prolifération des LTs (Van Gisbergen et *al.* 2005). Tels résultats suggèrent que les DCs participent au contact avec d'autres DCs et avec les LTs, mais également dans l'activation des LTs.

4.5. Rôle de DC-SIGN dans les pathologies:

DC-SIGN est une lectine qui reconnaît des pathogènes viraux et non viraux. En cas d'une exposition à des pathogènes, la DC via DC-SIGN va interagir avec ce dernier. Le pathogène associé à DC-SIGN sera internalisé dans un endosome précoce puis sera adressé jusqu'aux endosomes tardifs. Une fois arrivé, le pathogène sera digéré en peptides antigéniques et apprêté au CMH II. Le CMH II une fois chargé de son peptide antigénique migrera jusqu'à la surface et exposera l'antigène au LT induisant ainsi une réponse immune (Engering et *al.* 2002). Certains pathogènes échappent à la surveillance du système immunitaire en tirant profit de la présence de DC-SIGN à la surface des DCs. Comme il a été mentionné pour le virus de l'Ebola, de l'hépatite C, du virus de la dengue, du cytomégalovirus (CMV), HIV-1, de l'herpès humain 8 (HHV-8), du coronavirus de SRAS, de *Mycobacterium tuberculosis*, d'*helicobacter pylori*, du *Streptococcus pneumoniae*, des champignons, de certains types de parasites et les tumeurs, tous interagissent avec DC-SIGN (de Witte et *al.* 2006, Rappocciolo

et *al.* 2006, Koppel et *al.* 2005, Halary et *al.* 2002). Le mécanisme de fuite des pathogènes du système immunitaire *via* DC-SIGN n'est pas bien élucidé dans la littérature actuelle. Les explications proposées sont un détournement des voies d'internalisations (pour le VIH-1) ou une interférence des signalisations entre les CLR et les TLRs (comme est rapporté dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis*). Dans un cas pathologique, DC-SIGN peut être utilisé par le pathogène pour contourner le système immunitaire et ses défenses (Engering et *al.* 2002).

4.5.1. DC-SIGN et la tuberculose:

Pour les DCs, DC-SIGN est le récepteur principal de la mycobactérie. Même si les DCs immatures expriment un niveau très important de récepteurs au mannose, les anticorps spécifique de DC-SIGN (CD11b et CD11c), en contraste avec les anticorps spécifiques des récepteurs de mannose, inhibent les interactions de DCs avec le *M. bovis* BCG et le ManLAM avec une efficacité de plus de 80% (Maeda et *al.* 2003, Turville et *al.* 2001). Cependant, DC-SIGN ne peut être considérée comme l'unique récepteur capable d'internaliser le BCG dans la DC puisque d'autres récepteurs prennent part à l'induction de l'immuno-suppression par la mycobactérie (Gagliardi et *al.* 2005). Il est possible que les phagosomes matures (endosomes tardifs/lysosomes) contenant la mycobactérie dans les DCs finissent par dégrader le pathogène. Alors que, dans les macrophages, les mycobactéries arrêtent la maturation du phagosome à un stage endosomal très précoce, permettant ainsi la prolifération des mycobactéries dans le corps humain (Turville et *al.* 2001).

L'interaction entre les DCs et la mycobactérie est reliée au travail combinatoire entre les familles de TLRs avec les CLR. Le ciblage de DC-SIGN par ManLAM induit une réponse altérée suite à une combinaison de signaux entre les CLR et les TLRs. Des études démontrent que l'interaction de ManLAM avec DC-SIGN induit une inhibition de la maturation des DCs normalement consécutive à l'interaction de LPS avec le TLR correspondant (TLR4). Or si l'interaction de ManLAM avec DC-SIGN est inhibée, en utilisant des anticorps spécifiques de DC-SIGN, la maturation des DCs induite par les LPS est de nouveau rétablie (Turville et *al.* 2001). Cela illustre que DC-SIGN, après interaction avec ManLAM, libère un signal qui interfère avec les signaux de maturation des DCs lié à l'interaction de *M. bovis* BCG avec les TLR4. Le mécanisme de suppression des signaux des TLRs par DC-SIGN n'est pas encore élucidé. Une explication de ce mécanisme est possible et se base sur la présence de l'ITAM au niveau de la parti cytoplasmique de DC-SIGN. Des

travaux ont démontré que d'autres CLR, comme la Dectin-1, participent également à la reconnaissance des pathogènes et la signalisation des TLRs. Celle-ci est capable d'induire l'expression des TNF- β et l'IL-12 des DCs avec le TLR2, et de promouvoir la réponse de Th1 (Gantner et *al.* 2002). Un tel résultat est également associé à la présence de l'ITAM au niveau de la Dectin-1. Les travaux mentionnés suggèrent plusieurs interactions entre les voies de signalisation des TLRs et des CLR pouvant induire un effet pro- et anti-inflammatoires induisant une activation ou une répression d'une réaction immune.

4.5.2. DC-SIGN et les tumeurs:

Il a été démontré que DC-SIGN est impliquée dans le mécanisme de tolérance tumorale par le système immunitaire (van Gisbergen et *al.* 2005). Dans le cas d'un cancer colorectal, des cellules dendritiques immatures sont localisées à l'intérieur des tumeurs et interagissent directement avec les cellules tumorales, alors que les cellules dendritiques matures sont présentes à la périphérie des tumeurs. La majorité des cancers colorectaux surexpriment un antigène carcino-embryonique (CEA), et une transformation maligne est responsable de la modification de son profil de glycosylation à la surface des cellules épithéliales du colon. Ce changement de glycosylation aboutit à la surexpression de Lewis X et l'apparition d'un nouveau sucre, le Lewis Y, au niveau du CEA de la zone tumorale (van Gisbergen et *al.* 2005). DC-SIGN n'interagit pas avec les cellules épithéliales normales du colon exprimant l'antigène Lewis X au niveau de leurs CEA. Des études démontrent qu'il existe des LTs spécifiques du CEA chez les patients atteints d'un cancer colorectal et qui jouent un rôle d'anti-cancer (Nargorsen et *al.* 2000). De tels résultats suggèrent que les DCs peuvent reconnaître et se lier aux cellules tumorales colorectales via DC-SIGN et participer à une réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, les cellules tumorales peuvent supprimer la maturation des DCs via DC-SIGN et ainsi échapper à la surveillance du système immunitaire. À cela s'ajoute un travail qui démontre que le CEACAM1 s'attache sélectivement et spécifiquement à DC-SIGN, et participe au développement tumoral (Bogoevska et *al.* 2006). Un travail plus approfondi sur la tolérance des cancers par les DCs devrait être réalisé pour mieux comprendre ce mécanisme complexe.

4.5.3. DC-SIGN et le VIH:

Des études précédentes ont démontré que DC-SIGN dispose d'une grande affinité pour le gp120 de l'enveloppe virale du VIH (Geijtenbeek et *al.* 2000a). Les DCs sont responsables

de la capture du VIH-1 sur les sites d'entrée (interface entre l'homme et son environnement) et le transport du virus jusqu'aux organes lymphoïdes secondaire. Une fois arrivée, les DCs interagissant avec les particules du VIH-1 vont transmettre d'une façon très efficace le virus au LT CD4⁺ (figure.4.7).

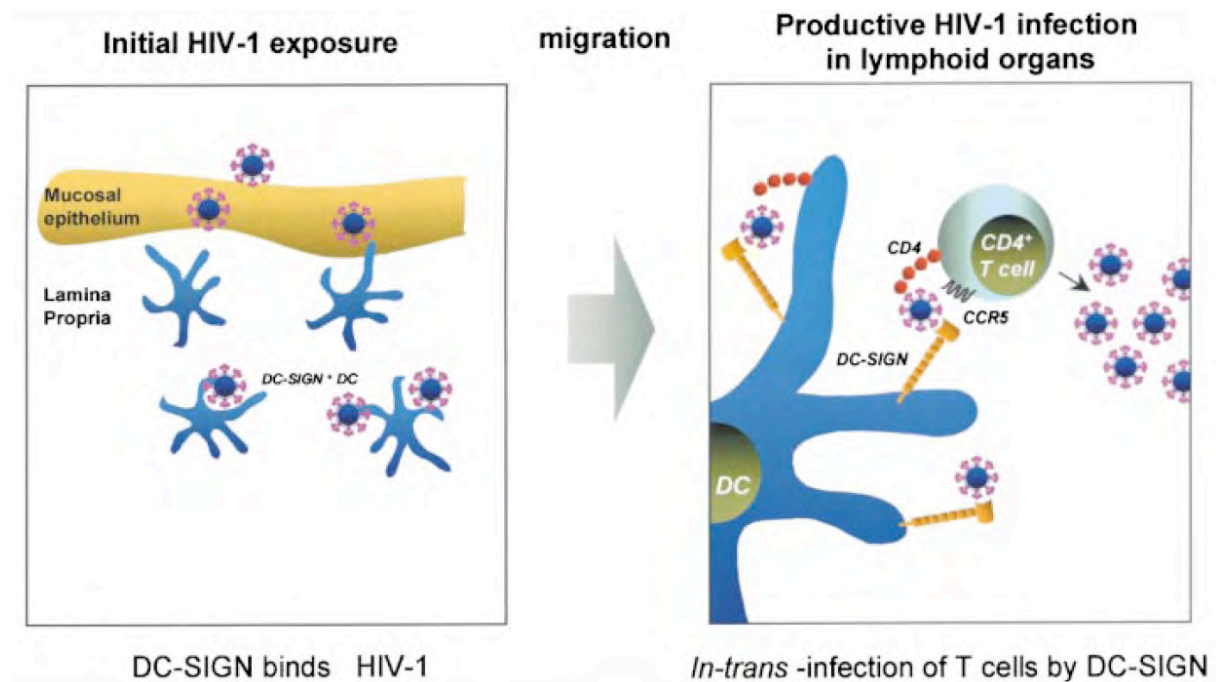


Figure.4.7: Présentation schématique de l'exposition des DCs aux VIH (à gauche) et de la présentation du VIH aux Lymphocytes T par les DCs via DC-SIGN (à droite). (image extraite de Geijtenbeek et *al.* 2002).

À ce niveau, DC-SIGN ne jouerait pas un rôle dans la dégradation des particules du VIH-1 en peptide « antigène » au sein des DCs, mais semble jouer un rôle dans la protection de ces particules virales contre la dégradation intracellulaire. Il n'y a pas d'interaction de DC-SIGN avec l'ICAM-3 dans un tel processus, mais d'autres molécules d'adhésion comme LFA-1, ICAM-1 prennent part au processus (Geijtenbeek et *al.* 2000a, Geijtenbeek et *al.* 2000b). Le mécanisme d'interaction de DC-SIGN avec le VIH n'est pas encore élucidé. Une explication plausible peut être la suivante: l'interaction de l'enveloppe virale avec DC-SIGN peut induire un changement conformationnel au niveau de l'enveloppe virale permettant d'améliorer l'interaction avec CD4 et/ou les récepteurs aux chimiokines. L'interaction de gp120 avec DC-SIGN pourrait faciliter ou stabiliser une de ces transitions. De plus, l'interaction de DC-SIGN avec le VIH-1 permet de les concentrer à la surface des DCs impliquant une augmentation de la probabilité de l'entrée virale après leur interaction avec

une multitude de récepteurs sur les cellules cibles, en l'occurrence les LTs (Geijtenbeek et *al.* 2000a, Geijtenbeek et *al.* 2000b).

Des études supplémentaires ont démontré que le VIH-1 perd totalement son activité s'il est gardé *in vitro* durant 24 heures, alors que l'interaction de DC-SIGN avec le VIH-1 permet de garder le virus à l'intérieur de DCs plus longtemps, permettant au virus internalisé de conserver son activité pendant 25 jours avant d'infecter la cellule cible. *In vivo*, le VIH-1 peut être transporté du tissu périphérique jusqu'aux ganglions lymphatiques après 2 jours de la contamination, alors que DC-SIGN fixant le VIH peut toujours infecter les cellules cibles après 5 jours (Turville et *al.* 2003, Zhou et *al.* 2004). Le mécanisme impliquant DC-SIGN dans la préservation de l'activité du virus n'est toujours pas élucidé. Une explication se basant sur l'internalisation du virus est privilégiée. Néanmoins, une étude récente démontre que l'internalisation du complexe DC-SIGN-VIH-1 n'est pas indispensable pour la capture du VIH par les DCs et la transmission efficace aux LTs CD4⁺ (Burleigh et *al.* 2006). Le mécanisme proposé par Geijtenbeek et *al.* impliquant l'internalisation et l'infection des LTs CD4⁺ est connue sous le nom de trans-infection, alors que celui proposé par les travaux de Burleigh et *al.* qui démontrent une infection des DCs par le VIH en amont d'une transmission virale aux LTs est appelé la Cis-infection. Après interaction avec DC-SIGN, le VIH-1 est transporté jusqu'au cytoplasme. DC-SIGN dispose d'une importante avidité pour le virus dans un milieu où règne un pH neutre. Cependant, celle-ci perd son avidité en milieu acide avoisinant le pH 5. Ceci suggère un mécanisme où le VIH-1 pourrait être libéré à l'intérieur du compartiment phagosomale où règne un milieu plus acide. Cela pourrait être à l'origine de l'obstruction de l'adressage de DC-SIGN/VIH jusqu'aux endosomes tardifs (Turville et *al.* 2003, Snyder et *al.* 2005).

CHAPITRE 5: Développements d'inhibiteurs

5.1. Introduction:

Le développement d'inhibiteurs, de ligands de DC-SIGN, implique la prise en compte de plusieurs facteurs déterminants. La nature oligomérique de DC-SIGN, sa présentation au sein de microdomaines membranaires et la faible affinité de ligands monovalents, poussent à considérer des inhibiteurs capables de multivalence. Un premier niveau d'optimisation est donc de trouver une structure, un mode de présentation multivalente d'un ligand spécifique. Dans un deuxième temps, le ligand ainsi présenté doit répondre à certains critères : une bonne affinité et spécificité pour le site de reconnaissance, une bonne solubilité et stabilité chimique. Dans le cas présent, où les ligands sont de type osidique, il faut également songer à la stabilité enzymatique vis-à-vis des glycosidases de sérum.

Ces deux dimensions, présentation multivalente et optimisation du ligand, seront abordées dans cette thèse. Le système de présentation multivalente choisie est de type dendrimérique. Ce chapitre définit les propriétés et les applications de telles molécules. L'optimisation de ligands sera abordée sous plusieurs angles : nature des sucres, mode de fonctionnalisation et de production d'analogues (glycomimics) reconnus par les lectines mais résistants aux glycosidases. Ce type de molécules et les stratégies associées sont aussi décrites dans ce chapitre.

5.2. Les Glycodendrimères:

La chimie des polymères et les technologies se sont traditionnellement concentrées sur les polymères linéaires, qui sont largement utilisés. Les macromolécules linéaires ne contiennent qu'occasionnellement de petites branches. De nombreuses études démontrent que les propriétés des macromolécules hyperbranchées peuvent être très différentes des polymères conventionnels. La structure de ces molécules a aussi un grand impact sur leur application.

Découverte au début des années 80 par Donalds Tomalia et son groupe (Tomalia et *al.* 1985), ces molécules hyperstructurées ont tout d'abord été appelées dendrimères. Ce mot dérive du mot grec « *dendron* » qui signifie arbre. Au même moment, le groupe de Newkome (Newkome et *al.* 1985) ont rapporté d'une façon indépendante la synthèse de macromolécules similaires. Ils les ont appelés les arbores du mot latin « *arbor* » qui signifie également arbre.

Le terme « molécule cascade » est également utilisé, mais le mot « dendrimère » est le terme le mieux établi. Un des premiers dendrimères à avoir été produit et sur lequel beaucoup de travail a été réalisé, est le PAMAM (polyamidoamine) qui servira d'exemple pour ce chapitre.

5.2.1. La synthèse:

Les dendrimères sont généralement préparés en utilisant soit la méthode divergente soit la méthode convergente (Hodge et *al.* 1993). Il existe une différence fondamentale entre ces deux concepts de constructions.

Dans la méthode divergente, les dendrimères grandissent en partant du centre, appelé le « core » ou le noyau. Il s'agit d'une molécule multifonctionnelle. La molécule noyau réagit avec une molécule monomérique comportant une fonction réactive et 2 groupes « dormants » donnant la première génération. Ensuite les deux groupes « dormants » situés à l'extrémité du monomère sont activés pour réaliser des réactions avec plusieurs monomères libres en solution. Le procédé est répété pour plusieurs générations et le dendrimère est construit génération après génération (figure.5.1).

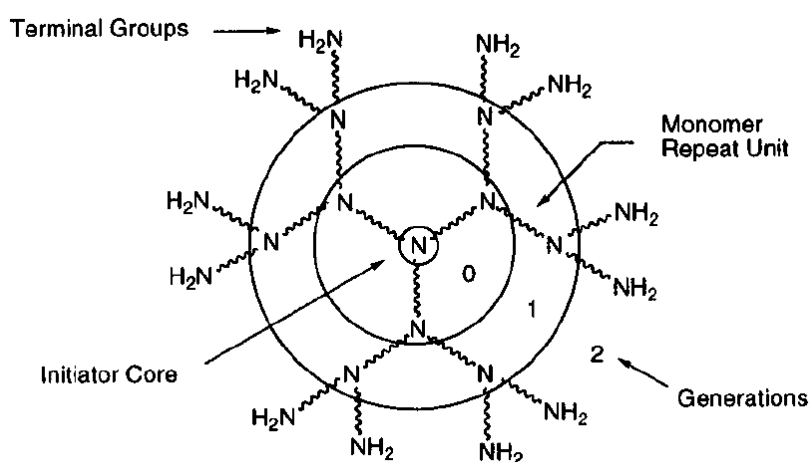


Figure.5.1: Représentation des différentes parties d'un dendrimère PAMAM (Klajnert et *al.* 2001)

L'approche divergente est adaptée à la production d'une large quantité de dendrimères. Son point faible réside dans les réactions secondaires ou incomplète au niveau des groupes se trouvant aux extrémités. Pour éviter ces réactions parasites et pour forcer la réaction, il est extrêmement important de mettre les monomères réactifs en excès. Néanmoins, cela cause quelques difficultés dans la purification du produit final (figure.5.2).

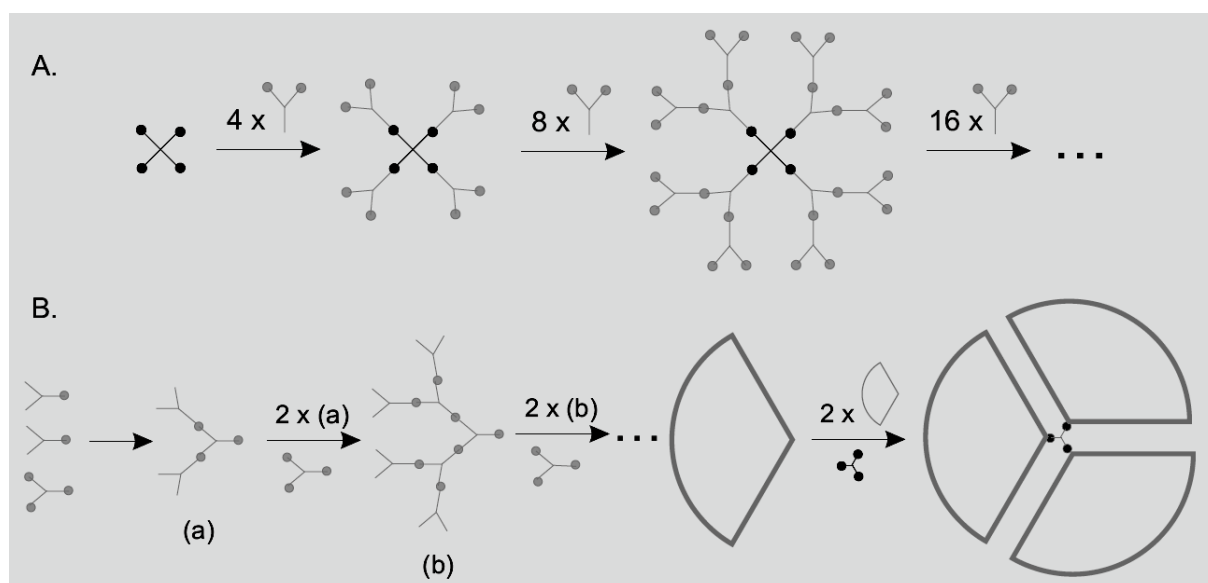


Figure.5.2: A.méthode de synthèse divergente ;B.méthode de synthèse convergente.

La méthode convergente est développée comme une réponse à la faiblesse de la synthèse divergente (Hawker et *al.* 1990). Dans l'approche convergente, la molécule est synthétisée dans le sens inverse puisque la synthèse commence par l'extrémité puis se dirige vers le centre. Quand les branches polymériques qui se développent, appelées dendrons, sont assez longues, elles vont être attachées à un noyau multifonctionnelle. La synthèse convergente dispose de plusieurs avantages. Il est relativement facile de purifier le produit désiré puisque l'obtention des produits dérivés parasites sont minimisés. Cela est dû au fait que les groupes actifs sont plus accessibles dans cette méthode de synthèse. Il est possible d'introduire une fonction dans la structure dendritique par emplacement de groupes fonctionnels à la périphérie de la macromolécule. L'approche convergente ne permet pas la formation des dendrimères avec un nombre de générations élevé à cause des problèmes d'encombrements stériques qui peuvent avoir lieu entre les dendrons et la molécule noyau.

[5.2.2. La structure moléculaire :](#)

Les dendrimères PAMAM de faibles générations (0, 1 et 2) possèdent une géométrie très asymétrique et ont une structure beaucoup plus ouverte par rapport à un dendrimère de haute génération (figure.5.1). C'est quand les chaînes partant de la molécule noyau deviennent plus longues et plus branchées (au niveau de la 4^{ème} génération et plus) que le dendrimère va adopter une structure globulaire et augmenter en terme de densité de compaction (Caminati et *al.* 1990). Quand le point critique de branchement sera atteint, les dendrimères ne pourront

alors plus augmenter en taille à cause d'un manque d'espace dans la structure (répulsion stérique importante). Cela est appelé l'effet « starbust » (Fischer et *al.* 1999). Pour le premier dendrimère appelé PAMAM, l'effet « starbust » est atteint à la 10^{ème} génération. Après ce stade, le niveau de la réaction chute brusquement et l'ajout des groupes sur les extrémités n'est plus réalisable. La 10^{ème} génération de PAMAM contient 6141 unités monomériques et a un diamètre de 124 Å (Tomalia et *al.* 1990). La croissance de la densité des branches avec les générations induit un impact croissant sur la structure du dendrimère. Ils sont caractérisés par la présence de cavités internes et par un grand nombre de groupes réactifs aux extrémités (figure.5.3).

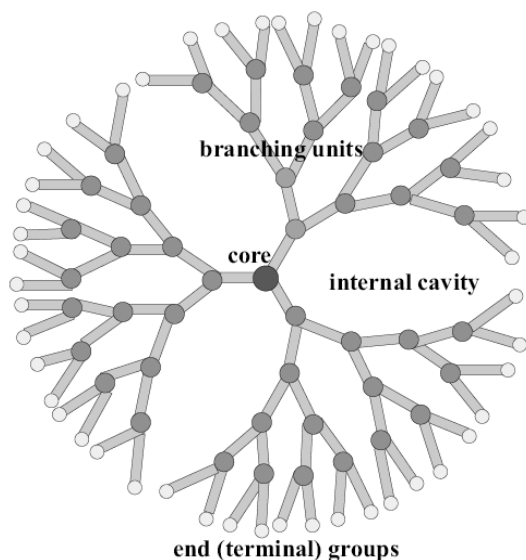


Figure.5.3: Représentation de la quatrième génération de dendrimère

Les copolymères dendritiques sont un groupe spécifique de dendrimères. Il existe 2 types de copolymères (Figure.5.4).

Segments-blocs dendrimères sont construits avec des segments dendritiques de différentes constitutions. Ils sont obtenus en attachant différents blocs de branchements à une même molécule noyau multifonctionnelle.

Couches-blocs dendrimères consiste à obtenir des sphères concentriques de différentes structures chimiques. En fait, ils sont le résultat de l'ajout de couches concentriques autour d'une molécule noyau multifonctionnelle.

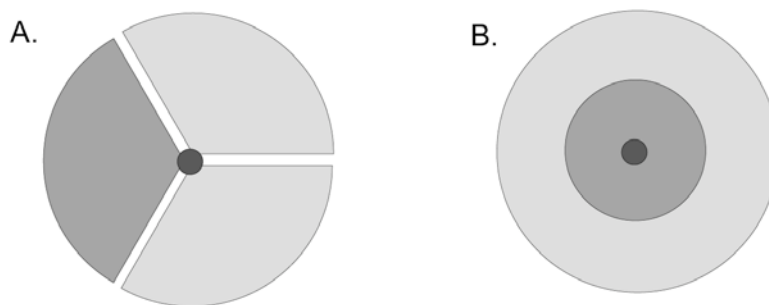


Figure.5.4: Les copolymères: A Segments-blocs dendrimères ;B. Couches-blocs dendrimères

Hawker et Frachet (Hawker et *al.* 1992) ont synthétisé un segments-bloc dendrimère qui possède un segment comportant une fonction éther et un segment disposant de deux fonctions ester. Ils ont également synthétisé une **Couche-bloc dendrimère**. Les deux premières générations sont liées par des fonctions ester et les trois dernières générations sont liées par des fonctions éther.

5.2.3. Propriétés:

Les dendrimères sont des macromolécules monodisperses, à l'opposé des polymères linéaires. Le processus de polymérisation classique qui aboutit à des polymères linéaires est normalement hasardeux dans la nature et produit des molécules de différentes tailles, à l'opposé du dendrimères dont la taille et la masse moléculaire pourraient être bien contrôlées durant la synthèse.

À cause de leur architecture moléculaire, les dendrimères se démarquent par leurs propriétés physico-chimiques par rapport au polymère linéaire traditionnel :

- En solution, les chaînes linéaires existent sous une forme flexible. En revanche, les dendrimères disposent d'une structure compacte et beaucoup moins flexible. Cela a un impact sur leurs propriétés en solution. La solution de dendrimères possède une viscosité nettement inférieure à celle d'un polymère linéaire équivalent (Fréchet et *al.* 1994). Quand la masse moléculaire des dendrimères croît, leur propriété de viscosité intrinsèque augmente jusqu'à un maximum pour la 4^{ème} génération et puis elle décroît (Mourey et *al.* 1992). Ce comportement n'est pas observable chez les polymères linéaires. Pour les polymères classiques, la viscosité intrinsèque croît progressivement et d'une façon continue avec le poids moléculaire.

- La présence de plusieurs extrémités de chaînes est responsable de la grande solubilité, miscibilité et réactivité du dendrimère (Fréchet et *al.* 1994). La solubilité des dendrimères est fortement influencée par la nature des groupes se trouvant à sa surface. Les dendrimères, qui

disposent sur les extrémités de leurs chaînes un groupe hydrophile, sont solubles dans des composés polaires, alors que les dendrimères qui déploient à l'extrémité de leurs chaînes des groupes hydrophobes sont solubles dans des solvants apolaires. Dans un test de solubilité dans du THF, la solubilité des dendrimères polyester est nettement supérieure à son analogue linéaire de polyester. Une différence importante est observée au niveau de la réactivité chimique. Le polyester dendritique est débenzylé par hydrogénolyse catalytique alors que le polyester linéaire demeure inactif.

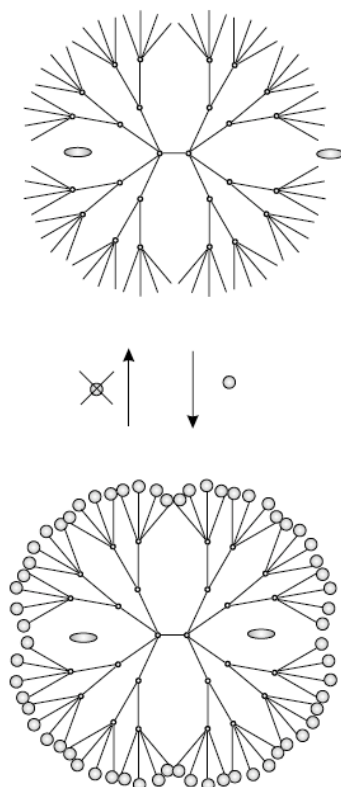


Figure.5.5: «la boîte dendritique » qui encapsule les molécules (Klajnert et al. 2001).

Les dendrimères disposent des propriétés uniques dues à leurs formes globulaires et la présence des cavités internes. Le plus important est celui de la possibilité d'encapsuler des molécules à l'intérieur de ces macromolécules. Meijer et al. (Jansen et *al.* 1994, Jansen & Meijer 1995) ont piégé plusieurs petites molécules comme l'acide p-nitrobenzoïque dans le dendrimère-boîte, connu sous le terme de « Dendritic box », de poly(propylène imine) avec 64 branches à la périphérie. Puis une coque est formée à la surface de ce dendrimère en faisant réagir les amines terminales avec des acides aminés (L-phénylalanine) et c'est ainsi que les molécules de l'acide p-nitrobenzoïque sont encapsulées dans ce dendrimère (figure.5.5).

L'hydrolyse de la coque externe permettra la libération des molécules piégées. La forme de la molécule à piéger, l'architecture du dendrimère-boîte et de ses cavités permet de déterminer le nombre de molécules piégées par le dendrimère. Le groupe de Meijer a décrit une expérience où ils ont pu capturer quatre molécules du rose du Bengale et de huit à dix molécules de l'acide p-nitrobenzoïque dans un seul dendrimère.

Les propriétés biologiques des dendrimères sont cruciales à cause de l'intérêt croissant dans leur utilisation pour des applications biomédicales. Les dendrimères cationiques (par exemple les PAMAM avec des groupes amines terminaux qui forment des groupes cationiques à des faibles pH) sont généralement homolytiques et cytotoxiques. Leur toxicité dépend de la génération et le nombre des groupes terminaux exposés à la surface du dendrimère (Roberts et *al.* 1996).

Les dendrimères PAMAM (générations 2, 3 et 4) interagissent avec les membranes des érythrocytes provoquant des changements dans la conformation des protéines. Ces changements augmentent avec le nombre de générations et la concentration des dendrimères. L'interaction entre la protéine et la demi-génération PAMAM dendrimères (2,5 et 3,5) sont faibles. Les dendrimères anioniques, comportant comme groupe de surface des carboxylates, ne sont pas toxiques pour une grande concentration de dendrimères même si, au-delà d'une certaine concentration le PAMAM anionique va se comporter comme le PAMAM cationique (Malik et *al.* 2000). L'incubation de cellules rouges humaines dans du sérum ou leur suspension dans un tampon phosphate avec du PAMAM cause la formation d'agrégats cellulaires.

5.2.4. Application:

Il existe à présent plus d'une cinquantaine de familles de dendrimères, chacune avec des propriétés uniques capables de s'adapter à une application donnée.

5.2.4.1. Outils de diagnostiques:

Plusieurs applications potentielles des dendrimères sont basées sur l'uniformité de leurs molécules, leurs surfaces multifonctionnelles et la présence des cavités internes. Ces propriétés spécifiques sont responsables de fait que ces dendrimères sont adaptés à une utilisation pour la haute technologie, qui pourrait aboutir à des applications biomédicales et industrielles. Les dendrimères ont été impliqués dans le diagnostic **in vitro**. La compagnie

« Dade international inc. » (USA) a introduit une nouvelle méthode pour les tests cardiaques. Les protéines présentes dans les échantillons de sang s'accrochent à des immunoglobulines qui sont fixées par des dendrimères sur une surface de verre. Les résultats détermineraient si le muscle cardiaque est endommagé ou pas. Cette méthode réduit d'une façon très importante le temps d'attente pour obtenir les résultats (8 minutes). En revanche, la réalisation du même test avec un échantillon choisis au hasard en présence de l'immunoglobuline seule, nécessite 40 minutes pour l'obtention des résultats. La conjugaison des dendrimères et des anticorps améliore également la précision et la sensibilité du test.

5.2.4.2. Imagerie médicale:

Les dendrimères ont été étudiés dans un stade pré-clinique comme agent de contraste pour la résonance magnétique. La MRI (Magnetic Resonance Imaging) est une méthode qui produit des images anatomiques des organes et des vaisseaux sanguins. Le fait de placer le patient dans un champ magnétique inhomogène défini et généré par la machine, conduit à un changement de résonance nucléaire des molécules d'eau détectable et le converti en image. L'ajout des agents de contraste (les cations métalliques paramagnétiques) améliore la sensibilité et la spécificité de la méthode. Le sel de Gadolinium de diethylenetriaminepentaacétique (DPTA) est utilisé cliniquement, mais il diffuse également à l'extérieur des vaisseaux à cause de son faible poids moléculaire (Fischer & Vögtle 1999). Les dendrimères, par leurs propriétés, sont très adaptés pour être des agents de contraste. Différents groupes ont préparé des dendrimères comportant des ions de gadolinium chélaté à leur surface (Wiener et *al.* 1996, Bryant et *al.* 1999). Les tests préliminaires montrent que les dendrimères chélateurs de l'ion sont meilleurs que les ions libres. Ils améliorent encore la visualisation des structures vasculaires dans le MRA (Magnetic Resonance Angiography) du corps. C'est la conséquence d'excellents résultats du rapport signal/bruits de fond (Bourne et *al.* 1996). Il y a eu des tentatives pour utiliser des dendrimères dans la livraison ciblée des médicaments et d'autres agents thérapeutiques. En effet, les molécules thérapeutiques peuvent être introduites dans les dendrimères ou attachées à leur surface.

5.2.4.3. Stratégie anti-infectieuse:

Les dendrimères sialylés, appelés sialodendrimères, ont été démontrés comme des potentiels inhibiteurs de l'homéo-agglutination des érythrocytes humains par le virus de l'Influenza. La première étape de l'infection par ce virus est l'attachement des virions à la surface des érythrocytes. Cet attachement a lieu à travers le récepteur viral, l'homéo-agglutinine, avec des groupes d'acide sialiques présents à la surface de la cellule (Sigal et *al.* 1996). Les sialodendrimères s'attachent à l'homéo-agglutinine et ainsi empêche l'interaction entre le virus et les cellules. Cela peut être utile dans le cadre de la lutte contre l'infection virale ou bactérienne. L'attachement de l'unité d'acide α -sialique à la surface des dendrimères améliore l'effet thérapeutique et permet aux dendrimères d'atteindre une haute activité dans l'inhibition de l'infection par l'Influenza (Roy et *al.* 1993, Zanini et *al.* 1998). L'inhibition croît en parallèle au nombre d'acides sialiques à la surface des dendrimères.

Les dendrimères peuvent être utilisés comme des agents chélateurs pour protéger ou pour permettre de livrer des médicaments à des sites spécifiques dans le corps, ou comme un système de libération prolongée d'un traitement au cours du temps. Le 5-Fluorouracil (5-FU) est connu comme étant une molécule très active contre les activités tumorales, mais elle possède un effet secondaire très toxique. Le PAMAM dendrimère après acétylation peut former un conjugué de dendrimère -5FU (Zhuo et *al.* 1999). Les dendrimères sont hydrosolubles et libèrent les 5FU d'une façon progressive par hydrolyse, réduisant ainsi la toxicité du 5FU. Des tels dendrimères semblent être potentiellement des transporteurs utiles des molécules anti-tumorales.

Les agents thérapeutiques peuvent aussi être attachés aux dendrimères pour un adressage ciblé. Un bon exemple d'une telle application est l'utilisation de la thérapie de capture de boron neutron (BNCT). Le BNCT est une approche expérimentale du traitement de cancer qui utilise un processus en deux étapes. Premièrement, un produit pharmaceutique non radioactif est injecté à un patient va être adresser jusqu'aux cellules tumorales. Ce composant comporte un isotope stable du bore (^{10}B). Puis le patient est irradié par un faisceau de neutron à basse énergie ou du neutron thermal. Les neutrons interagissent avec le bore dans la tumeur et génèrent des particules alpha, qui détruisent les cellules tumorales et qui laissent les cellules saines intactes (Hawthorne 1993). Afin d'avoir une réaction cellulaire létale, il faut que cette large quantité de bore injecté soit introduite dans les cellules tumorales. Les dendrimères attachés d'une façon covalente à un atome de bore ont été préparés et le premier test sur ces

composés ont donné des résultats positifs (Barth *et al.* 1994, Liu *et al.* 1995, Capala *et al.* 1996).

Les dendrimères peuvent agir comme des transporteurs, appelés vecteurs, dans la thérapie génique. Les vecteurs transfèrent des gènes à travers la membrane cellulaire jusqu'au noyau. Fréquemment ce sont les virus génétiquement modifiés et les liposomes qui sont utilisés dans ce but. Les dendrimères PAMAM ont également été testés comme un transporteur génétique (Bielinska *et al.* 1996, Kukowska-Latallo *et al.* 2000). Ils exposent à leur surface des groupes amines capables d'interagir avec les groupes phosphates de l'acide nucléique. Cela assure la formation d'un complexe de transfection. Un agent de transfection appelé SuperFect™, basé sur une structure dendrimerique, est déjà commercialisé. Un dendrimère activé peut porter une quantité de matériels génétiques plus importante que le virus. Le complexe SuperFex-ADN est caractérisé par une haute stabilité et présente une meilleure façon de transporter l'ADN vers les noyaux que le liposome. La haute efficacité des dendrimères dans la transfection ne peut pas être due uniquement à leurs structures bien définies mais aussi au bas pKa (3,9 et 6,9). Le bas pKa permet au dendrimère de tamponner le changement de pH dans le compartiment intracellulaire (Haensler *et al.* 1993).

5.2.4.4. Catalyseurs chimiques:

En plus des applications biomédicales, les dendrimères peuvent être utilisés pour améliorer plusieurs processus industriels:

La combinaison des grandes surfaces et de la haute solubilité ont permis aux dendrimères d'agir comme un catalyseur à l'échelle nano (Tomalia & Dvornic 1994). Ils combinent l'avantage de la catalyse homogène et inhomogène. La catalyse homogène est efficace, due à leur bonne accessibilité aux sites actifs, mais ils sont souvent très durs à séparer du mélange réactionnel. La catalyse hétérogène est facile à séparer du mélange réactionnel, mais la cinétique de la réaction est limitée par le transport de masse. Les dendrimères ont une surface multifonctionnelle et tous les sites catalytiques sont toujours exposés dans la direction du mélange réactionnel. Ils peuvent être séparés du mélange réactionnel par une simple ultracentrifugation. Le premier exemple d'un dendrimère catalytique était décrit par le groupe de van Koten (Knapen *et al.* 1994). Ils ont introduit à la périphérie d'un dendrimère du polycarbosilane soluble un complexe de diamino arylnickel (III). Un tel dendrimère peut être utilisé dans les réactions d'addition de polyhaloalkanes.

5.3. Les analogues osidiques non hydrolysables: les « glycomimics »

Les lectines sont des protéines qui reconnaissent des glycoconjugués, mais ne catalysent pas leur transformation. À l'origine, découvertes chez les plantes et dans le venin des serpents, les lectines ont été identifiées comme responsables de la reconnaissance des bactéries, des virus et des parasites grâce à un profil de glycosylation spécifique présent à leurs surfaces. Le domaine de reconnaissance de sucre (CRD) est capable de reconnaître un complexe d'oligosaccharide d'une façon sélective, néanmoins les facteurs déterminant de cette reconnaissance sont souvent dus à 2 résidus qui apparaissent au sein de ces séquences et qui les entraînent dans le site de fixation du CRD.

L'identification d'inhibiteurs synthétiques pour les lectines a été abordée par des modélisation informatique (Drug Design) et par synthèse de molécules qui miment les structures des oligosaccharides, appelées « glycomimics » (Kaila et *al.* 2007, Borrok & Kiessling 2007). Dans ce contexte, les glycomimics sont des molécules dont la structure tridimensionnelle imite les parties de l'oligosaccharide indispensables à l'interaction avec le site actif de la lectine d'intérêt. Ils sont majoritairement composés d'une ou deux unités saccharidiques reconnus par le CRD de la lectine, et associés à une ou plusieurs unités non saccharidiques, appelées « aglycon ». Le rôle de « l'aglycon » pourrait être l'adressage, l'orientation de la partie sucrée dans le site actif de la lectine. Il peut également conférer des propriétés pharmacologiques à la partie sucrée comme améliorer la lipophilie ou la résistance à l'hydrolyse enzymatique.

Le travail de synthèse de glycomimics se base sur les observations suivantes:

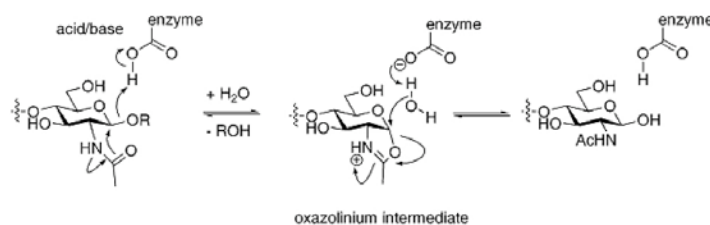
- a) L'interaction réalisée entre une longue chaîne oligosaccharidique et une lectine est normalement limitée à une petite portion de cette chaîne.
- b) Même si les molécules oligosacchariques ont une structure flexible, en comparaison à d'autres macromolécules, certaines de ces longues structures sucrées préfèrent conserver des conformations bien spécifiques (Roseman 2001).
- c) Différentes lectines sélectionnent différentes conformations d'un oligosaccharide flexible (Jiménez-Barbero et *al.* 1999). Certaines lectines reconnaissent des unités sucrées dans des conformations qui ne constituent que 5 à 10% du sucre dans son état libre.

5.3.1. Le mécanisme d'action des glycosidases:

Le problème majeur des inhibiteurs à base de sucre injectés dans le sérum humain c'est les glycosidases. Il existe plusieurs types de glycosidases classées selon :

- La position au sein de laquelle elles clivent la chaîne sucrée : si elles clivent à l'intérieur de la séquence osidique, elles sont appelées endo-glycosidases. Par contre si le clivage est réalisé sur l'extrémité non réductrice de la séquence sucrée alors il s'agit d'exo-glycosidases.
- Selon la nature des liaisons osidiques clivées: O ou N-osidique.
- Selon la stéréochimie du produit d'hydrolyse final (Sinnot 1990). (figure.5.6).

A.



B.

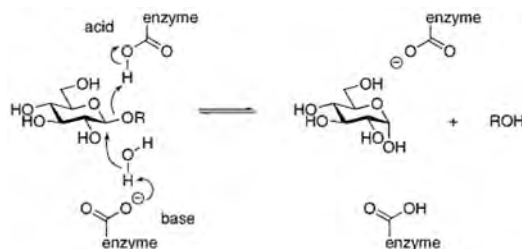


Figure.5.6: Exemple de deux mécanismes d'hydrolyse de liaison O-glycosique. (A) Correspond à un mécanisme d'hydrolyse réalisé par une enzyme aboutissant à une conservation de la stéréochimie du départ du sucre en impliquant un seul groupe carboxylique du site actif de l'enzyme. Ce dernier va agir à la fois comme une base au départ puis comme un acide. (B) Correspond à un mécanisme d'hydrolyse réalisé par une enzyme inversant la stéréochimie de départ du sucre en impliquant 2 groupes carboxyliques du site actif de l'enzyme. L'un des groupes carboxyliques va agir comme base et l'autre comme acide (Vocadlo et *al.* 2001).

Afin d'empêcher l'hydrolyse des structures osidiques par les enzymes, plusieurs stratégies de synthèse de mimics ont été développées.

5.3.2. Deux approches réalisées pour la conception des « glycomimics »:

Le premier exemple est issu d'un travail sur les sélectines. Celles-ci sont un groupe de lectines qui reconnaissent les tétrasaccharides sialyl Lewis-X. Il existe 2 types d'approche

pour effectuer une modélisation d'un mimic similaire au ligand naturel de cette lectine. Le premier implique la suppression de toutes les liaisons qui n'interagissent pas avec les résidus du site actif, tout en gardant les liaisons entre les unités intactes. Cette approche réduit la polarité des sucres, ce qui accroît l'affinité pour le site actif en augmentant les interactions hydrophobes. L'addition d'un groupe hydrophobe ou un groupe chargé peut également être bénéfique. La stabilité des liaisons O-glycosidiques, qui sont connues pour avoir une courte durée de vie, peut être améliorée en échangeant ces liaisons par des liaisons C- ou S-osidiques. Par exemple, Pierre Senay a publié en 1998 un maltose où l'oxygène impliqué dans la liaison O-glycosidique a été remplacé par un carbone stabilisant ainsi cette liaison vis-à-vis des glycosidases (Senay 1998) (figure.5.7). Comme le démontre la figure.5.6, l'attaque nucléophile réalisée par une molécule d'eau va permettre de cliver la liaison O-osidique. Ce clivage est en réalité une substitution de l'oxygène, lié au C4 du premier cycle, par l'oxygène d'une molécule d'eau sur le C1 du deuxième cycle. Ainsi, quand l'oxygène de la liaison O-osidique est remplacé par un carbone, il sera alors difficile pour l'atome d'oxygène de la molécule d'eau de le remplacer puisque le carbone est un très mauvais groupe partant.

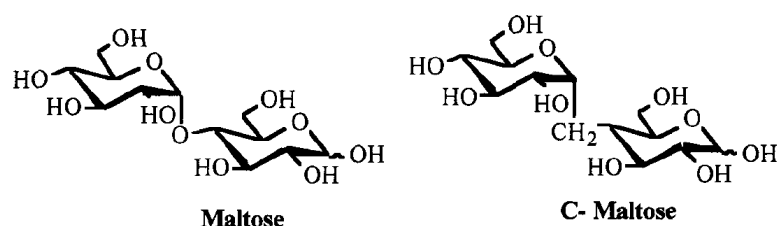


Figure.5.7: Représentation du maltose (à gauche) et de son « mimics », le C-Maltose, résistant aux glycosidases.

La deuxième approche consiste à contrôler la forme du mimic tout en ajoutant un groupe supplémentaire qui a pour rôle d'améliorer l'affinité pour le CRD de la sélectine: le cyclohexanediol qui remplace le 3,4-GalNac di-substitué dans le Sialyl Lewis-X (SLe^X) et l'acide sialique est remplacé par un stéréocentre de soufre associé par une fonction éther au Galactose (Kolb & Ernest 1997). Ernst et Kolb ont démontré que cette configuration favorise l'orientation gauche de l'acide carboxylique associé par rapport au cycle du galactose (figure.5.8), qui possède une activité biologique lors de l'interaction de SLe^X avec la E-sélectine. Les cyclohexanediols sont résistants aux glycosidases du fait de l'absence de l'oxygène au sein de son cycle. En fait, une fois le OH ou le groupe OR (R=chaîne sucrée) en C1 est enlevé, une charge positive apparaît en C1. Cette charge sera stabilisée par un doublet électronique provenant de l'oxygène. C'est la formation d'un carbocation stabilisé qui sera un

des éléments moteurs de l'hydrolyse, puisque la réaction est favorable. Le remplacement de l'oxygène du cycle par un carbone va permettre, en cas de départ du RO ou d'OH du C1, de former un carbocation secondaire non stabilisé par un doublet électronique. Ainsi, la réaction d'hydrolyse devient défavorable puisque le produit de l'hydrolyse est instable.

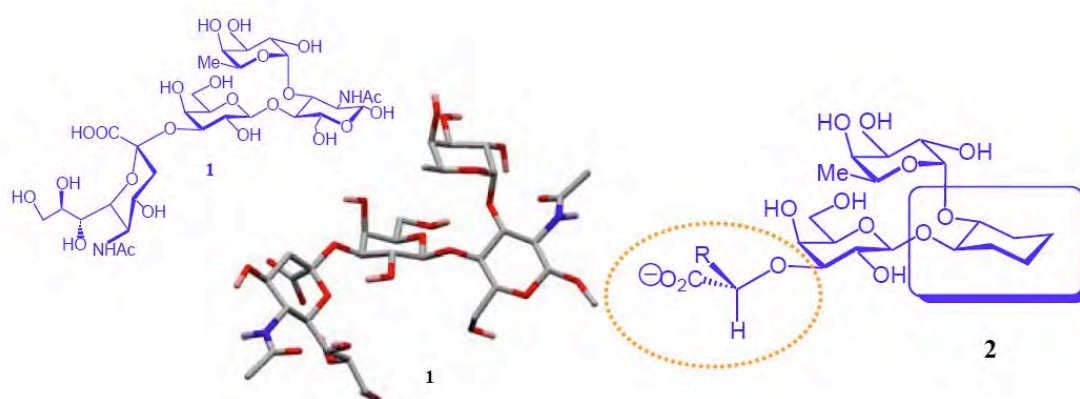


Figure.5.8: Sialyl Lewis-X et le Novartis mimic 2. En (1) la représentation dans un plan ou en 3D de la structure de Lewis-X. En (2) Le Novartis mimic avec le N-acétyl-Glucosamine remplacé par du cyclohexendiol.

En se basant sur ces résultats, le groupe d'Anna Bernardi a introduit des molécules mimics ressemblant à des structures glycosidiques qui disposent de 2 énantiomères purs et des conformations stables de cyclohexanediols 3 et 4 (voir figure.5.9). Ces molécules sont modélisées pour imiter le profil de branchement des sucres qui incorporent un ou plusieurs substituants en position axiale, comme les motifs associant le 3,4-galactose et le 1,2- α mannose, fréquemment trouvés dans les structures osidiques bioactives (Bernardi et *al.* 2001). Ils ont été utilisés pour synthétiser des analogues structuraux et fonctionnels des composés carbohydratés (appelés les pseudo-oligosaccharides) qui interagissent avec des lectines. Les deux groupes carboxyliques des cyclohexanediols cités, qui se comporte comme un frein pour les transitions conformationnelles des cyclohexanes, peuvent également être exploités pour réaliser des liaisons avec différents supports, ainsi permettant la synthèse des pseudo-glycoconjugués polyvalents.

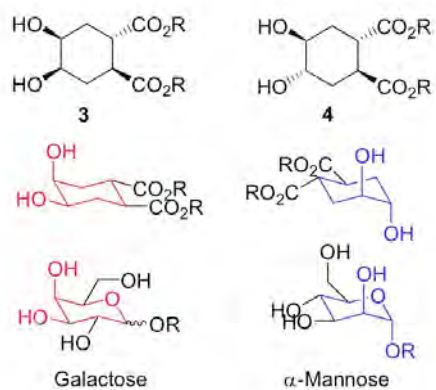


Figure.5.9: Les squelettes de dicarboxy cyclohexanediol (DCCHD) des deux mimics disubstitués : le motif 3,4 galactose et le motif 1,2- α mannose.

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

1. Souches bactériennes utilisées:

- TOP10:

Cette souche possède le génotype suivant: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 *lacX74 deoR recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* (INVITROGEN). TOP10 est utilisée préférentiellement pour les transformations, lorsque celles-ci ne nécessitent pas une souche particulière. En effet, TOP10 présente un taux de transformation élevé.

- BL21(DE3):

Cette souche possède le génotype suivant: F ϕ *ompT hsdS_B* (rb- mb-) *gal dcm* (DE3) (Novagen). BL21(DE3) est utilisée pour la production protéique. Dans cette souche, les deux recombinaisons majoritaires exprimées normalement dans cette souche sont inactivées.

2. Biologie moléculaire:

2.1. Construction du plasmide exprimant DC-SIGN SEC:

Toutes les constructions de la protéine DC-SIGN ont été réalisées à partir du vecteur pET30b dans lequel le laboratoire a cloné l'ADN codant pour le segment extracellulaire du DC-SIGN humain. Au départ, ce gène a été amplifié par PCR puis cloné dans le vecteur pASK7 (IBA) qui permet l'ajout d'une séquence codante pour une étiquette Strep-tag II en N-terminal suivie d'un site de coupure au facteur Xa. L'insert codant pour DC-SIGN EC avec le Strep-tag II, le DC-SIGN SEC, a été ensuite clivé puis sous-cloné dans le vecteur pET20b (Novagen) en vue d'améliorer l'expression de la construction.

Des cellules *E.coli* BL21(DE3) ont ensuite été transformées par les plasmides construits pour l'expression des protéines.

2.2. Amplification de l'insert d'un plasmide:

Les PCR ont été réalisées en utilisant 100 μ L de milieu réactionnel contenant les réactifs ci-dessous :

-20 ng de matrice ADN,

- 0,25 ng de chaque amorce nucléotidique,
- 0,2 mM de chaque dNTP,
- 1 mM MgCl₂,
- Tampon de réaction 1X,
- 2 unités de Pfu polymérase (Stratagène).

Les 100µL de réaction sont placés dans une machine à PCR (thermocycleur) et un protocole standard de PCR a été utilisé pour amplifier DC-SIGN EC, ceci ayant été répété 33 fois:

- 94 °C pendant 1 minute,
- 94 °C pendant 45 secondes,
- 50 °C pendant 1 minute,
- 72 °C pendant 2 minutes,
- 72 °C pendant 10 minutes (au dernier cycle uniquement).

Les séquences des amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification de DC-SIGN EC sont : EC 5' (5'- GCA TTA GGT CTC TGC GCT CCA TAA GTC AGG AAC AAT C - 3') et EC 3' (5'- GCA GCA GGT CTC TTA TCA CTA CGC AGG AGG GGG G - 3').

2.3. Construction du plasmide DC-SIGN SNeck (mutagenèse dirigée):

Les mutations ponctuelles ont été réalisées grâce au kit de mutagenèse dirigée « Quick Change mutagenesis kit » (Stratagène, La Jolla, CA) en utilisant 50µL de volume réactionnel contenant les réactifs ci-dessous :

- 50 ng de matrice d'ADN,
- 125 ng de chaque amorce nucléotidique,
- 35,5 µl d'H₂O doublement déionisée et distillée,
- 10% DMSO,
- 125 ng de chaque amorce nucléotidique,
- Le tampon de réaction,
- 2,5 unités de polymérase Pfu Ultra II (Stratagène).

Les séquences des amorces nucléotidiques utilisées sont : Neck Mut 5' (5'-GTG GAA CGC CTG TGC TGA CCC TGT CCC TGG G-3') et Neck Mut 3' (3'-CAC CTT GCG GAC ACG ACT GGG ACA GGG ACC C-5'). Le codon souligné correspond au codon stop intégrer entre la région codante pour le domaine Neck et la région codante pour le domaine CRD.

Les 50µL de la réaction sont placés dans une machine à PCR (thermocycleur) et la mutagenèse est effectuée selon le programme suivant, répété 16 fois pour réaliser une mutation ponctuelle:

- 95°C pendant 1 minute
- 95°C pendant 45 secondes
- 55°C pendant 1 minute
- 68°C pendant 6 minutes (1 minute x nombre de kb du plasmide)

L'ADN parental non muté, provenant de *E.coli*, est méthylé contrairement à l'ADN muté synthétisé *in vitro*. Les produits de la réaction sont digérés pendant 2 heures à 37°C avec 10 unités de l'enzyme de restriction DpnI qui clive spécifiquement l'ADN parental méthylés.

Après transformation des cellules compétentes d'*E.Coli* (Top10) par le produit de réaction, les clones obtenus sont sélectionnés sur gel d'agarose en présence d'antibiotiques. Le choix de l'antibiotique dépend du gène de résistance présent au niveau du plasmide d'intérêt. Une PCR sur colonies est ensuite réalisée pour chaque colonie ayant poussé dans ce milieu sélectif (protocole identique au paragraphe 2.2). Les plasmides amplifiés sont ensuite clivés avec des enzymes de restriction qui correspondent au site de clonage du gène d'intérêt et migreront sur un gel d'agarose 1%. Les clones positifs à la présence du gène d'intérêt sont alors séquencés afin de vérifier la présence de la mutation.

[2.4. Digestion du plasmide par les enzymes de restriction:](#)

Dans toutes les constructions plasmidiques réalisées, le protocole de digestion par les enzymes de restriction était : 50 µL de plasmide (100 ng), 0.25 U de chaque enzyme de restriction utilisée. 25 µL d'H₂O stérile, 10 µL tampon de digestion (1X). La digestion dure 4h à 37°C.

[2.5. Ligation des plasmides:](#)

Les ligations des plasmides sont réalisées selon le protocole de « Rapid DNA ligation Kit » (Roche).

3. Biochimie:

3.1. Croissance cellulaire et surexpression de la protéine d'intérêt:

Une culture est préparée en diluant au 1/30^{ème} une préculture à saturation dans le milieu LB (Luria Bertani) supplémentée de 100µg/mL d'ampicilline ou kanamycine (Euromedex). Les cellules sont laissées à 37°C sous agitation (220rpm) jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO de 0,7. L'expression de la protéine est alors induite par l'ajout d'1mM IPTG (Euromedex). Après 3 heures d'expression à 37°C, les cellules sont centrifugées à 6 000g pendant 25 minutes.

3.2. Préparation d'extrait brut:

Les culots bactériens obtenus sont resuspendus à 4°C dans le tampon de lyse (20mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 10mM MgCl₂, DNase I et une tablette d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Complete®EDTA-free, Roche)). Les cellules sont alors lysées par sonication (2 minutes totales de sonication par pulse de 2 secondes à 40% d'amplitude espacées de 10 secondes).

3.3. Étapes de purification:

3.3.1. À partir de corps d'inclusion:

3.3.1.1. Renaturation des protéines:

3.3.1.1.1. Isolement et lavage des corps d'inclusion:

Après lyse, les corps d'inclusion contenant la protéine DC-SIGN recombinante sont récupérés après centrifugation à 10 000 g pendant 25 min à 4°C. Deux lavages successifs des culots sont réalisés dans 10 ml de tampon 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH= 7.8, 2 M Urée, 1 % Triton, puis dans 10 ml de tampon 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH= 7.8, 1 % Triton.

3.3.1.1.2. Solubilisation de corps d'inclusion:

La solubilisation des corps d'inclusion est réalisée dans 20 ml de **tampon S** contenant des agents chaotropes et réducteurs des ponts de sulfures : 10 mM Tris-HCl pH= 7.8, 6 M Guanidine-HCl et 0.01 % β-mercaptoéthanol. Une nouvelle sonication précède une

ultracentrifugation à 137 000 g pendant 30 min à 4 °C qui permet de récupérer des protéines solubilisées et dénaturées.

3.3.1.1.3. Renaturation:

La concentration en protéines dénaturées est amenée à 2 mg.ml⁻¹ dans le **tampon S**. La protéine est diluée par ajout goutte à goutte de leur tampon de dilution (150 mM NaCl, 25 mM Tris - HCl pH=7.8, 25 mM CaCl₂) sous agitation douce à 4°C, avec un rapport conduisant au final à une dilution d'un facteur 5. La guanidine est éliminée par dialyse de la solution contre 4 fois le volume de tampon de dilution. Quatre changements de bain de dialyse sont effectués. La protéine soluble est récupérée dans le surnageant après une ultracentrifugation à 40 000 rpm (rotor Beckman Ti 45) d'une heure à 4°C.

3.3.1.2. Purification des protéines recombinantes sur colonnes:

La solution protéique est concentrée à 4°C à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration munie d'une membrane de polyéthersulfone de seuil de coupure 10 KDa (Viva science). En effet, DC-SIGN est une lectine, et les membranes de cellulose utilisées classiquement fixent la protéine. En revanche, le polyéthersulfone est neutre vis-à-vis de DC-SIGN. Le suivi de la concentration est réalisé par spectrophotométrie.

3.3.1.2.1. Chromatographie d'affinité sur colonne Mannan-Agarose:

La résine de Mannan-Agarose est obtenue auprès de la société Sigma. Les protéines sont purifiées à température ambiante par chromatographie d'affinité sur une colonne Mannan-Agarose de 10 ml à un débit de 1 ml.min⁻¹. L'équilibration et le lavage sont réalisés avec le **tampon A** (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH= 7.8, 4 mM CaCl₂). Les protéines sont éluées grâce au **tampon B** contenant un chélateur de cations divalents : 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH= 7.8, 10mM EDTA. L'échantillon est concentré jusqu'à un volume compris entre 2 et 5 mL.

3.3.1.2.2. Chromatographie par exclusion de taille:

Les chromatographies d'exclusion de taille utilisées sont toujours des superoses pour les différentes constructions de DC-SIGN disposant du domaine de reconnaissance de sucre

(CRD). La matrice de la résine de superose est à base de galactose et qui n'est pas un ligand de nos lectines d'intérêt contrairement aux matrices superdex contenant du glucose.

La filtration sur gel est ainsi réalisée sur une colonne Superose 6 de 110 ml équilibrée avec le tampon A. L'échantillon protéique est déposée sur la colonne puis élué avec le même tampon à un débit de 1 ml.min⁻¹. Un gel SDS-PAGE contrôle l'efficacité de cette purification.

3.3.2. À partir d'extraits solubles:

3.3.2.1. Lyse des cellules:

Après lyse, la protéine DC-SIGN recombinante est exprimée sous forme soluble est récupérée dans le surnageant suite à une centrifugation à 40 000 rpm (rotor Beckman TI 75) pendant 1h à 4°C. Un gel SDS-PAGE est réalisé avec des échantillons du surnageant et du culot pour vérifier la présence de la protéine dans la phase soluble.

3.3.2.2. Purification des protéines recombinantes sur colonne de Strep-Tactine:

La solution protéique a été concentrée à 4°C par ultrafiltration comme décrit précédemment. Les protéines sont purifiées à température ambiante par chromatographie d'affinité sur une colonne de Strep-Tactine (IBA) de 25 ml à un débit de 2,5 ml.min⁻¹. L'équilibration (3 volumes colonne) et le lavage (2 volumes colonne) sont réalisés avec le **tampon C** (0,2M NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH= 7.8). Les protéines sont éluées grâce au **tampon D** (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH= 7.8, 1mM EDTA et 2,5 mM D-desthiobiotine). Le tampon contenant de l'EDTA et de la D- desthiobiotine (IBA) est essentielle à la libération du Strep-tag II de la résine Strep-Tactine. La régénération de la colonne est effectuée en utilisant le **tampon E** (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH= 7.8, 1mM EDTA, 1mM HABA (IBA)). L'HABA conduit à l'élimination de la D- desthiobiotine fixé sur la Strep-Tactine. L'HABA est éliminé de la colonne en utilisant le **tampon F** (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH= 7.8, 1mM EDTA). Après purification sur la première colonne, la protéine est concentrée dans ultrafiltration avec une membrane de seuil de coupure 10 KDa.

3.3.2.3. Coupure de l'étiquette Strep-tag II:

L'étiquette de Strep-tag II est clivable grâce au site de reconnaissance au facteur Xa situé entre le streptag II et la protéine. Des tests de coupure à petite échelle sont réalisés au préalable à 4°C afin de déterminer les conditions de coupure optimales en termes de rapport enzyme/protéine (0,4 U/1,5 mg) et de temps d'incubation (15 minutes à 7 heures). Les échantillons provenant des différentes conditions de coupure sont alors analysés sur gel SDS-PAGE et la meilleure condition (qui correspond à une coupure complète) est appliquée à grande échelle sur la protéine purifiée. Lorsque la coupure est terminée, l'enzyme est inhibée par un chauffage de l'échantillon à 80°C pour 2 minutes. Le produit de la réaction est alors analysé par SDS-PAGE et spectrométrie de masse.

3.3.2.4. Chromatographie d'exclusion de taille:

L'échantillon clivé ou non par le facteur Xa est à nouveau chargé sur une colonne d'exclusion de taille afin d'enlever les fragments d'étiquettes Strep-tag II résiduels. Il s'agit de la colonne Superdex 200 (110 ml) équilibrés avec le tampon D. Ainsi l'échantillon protéique déposé sur la colonne est élué avec le même tampon à un débit de 1 ml.min⁻¹. La pureté des fractions est alors analysée par SDS-PAGE et spectrométrie de masse.

Toutes les préparations des protéines ont été vérifiées selon deux analyses « critère-qualité » : séquençage N-terminal et spectrométrie de masse.

4. Analyse Biophysiques:

4.1. Séquençage N-terminal:

L'identification de la séquence d'acides aminés à l'extrémité N-terminale des protéines étudiées dans cette thèse a été effectuée selon le principe de la dégradation d'Edman, réalisée sur un séquenceur en phase gazeuse modèle 492 (Applied Biosystems). C'est un processus cyclique par lequel les acides aminés sont clivés un par un à partir du N-ter de la protéine, et identifiés par HPLC comme dérivés de phenylthiohydantoine. Ce séquençage a été réalisé au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) à l'IBS par Jean-Pierre Andrieu.

Cette technique permet d'analyser des échantillons en solution ou de séquencer des protéines préalablement fixées sur une membrane. Nous avons choisi cette dernière méthode dans le cas où plusieurs bandes apparaissent sur un gel SDS-PAGE ainsi de cette manière les différentes bandes ont été analysées séparément.

4.2. Le protocole utilisé pour le séquençage N-terminal:

Afin de réaliser une analyse par séquençage N-terminal, 30µg de protéines (la protéine d'intérêt ou ses produits de dégradation) sont d'abord séparés par un gel dénaturant de tricine à 15% d'acrylamide. Le gel est ensuite lavé dans 10mM CAPS pH 11, 10% méthanol. La membrane PVDF ProBlott (TM) (Applied Biosystems), préalablement lavée dans le méthanol, et trempée dans ce même tampon et déposée sur le gel d'acrylamide. Les protéines sont alors transférées du gel vers la membrane après application d'une tension de 100V pendant 1h30 à l'aide d'un appareil de Western Blot. La membrane est ensuite colorée par du bleu de Coomassie dans 50% méthanol, 1% acide acétique pendant 5 minutes puis décolorée dans 50% méthanol pendant 2 fois 10 minutes. Les bandes correspondant aux protéines sont découpées et soumises au séquençage N-terminal comme décrit précédemment.

Ceci a permis d'identifier les trois constructions protéiques et d'estimer le taux de dégradation obtenues à la fin de chaque purification de protéines.

4.3. Spectrométrie de masse:

4.3.1. Principe:

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de mesurer le rapport masse/charge d'ions isolés en phase gazeuse, et ainsi de mesurer la masse de protéines ou de peptides. À l'IBS, elle est réalisée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP). Un spectromètre de masse est constitué de 3 parties distinctes: une source d'ionisation qui assure la production des ions en phase gazeuse, un analyseur qui permet de séparer les ions en fonctions de leur rapport masse/charge et un détecteur qui transforme le courant ionique en un signal mesurable. Les sources d'ionisation MALDI (Matrix –Assisted Laser Desorption-Ionisation) et ESI (ElectroSpray ionisation) sont les plus couramment employées en biologie. Elles sont décrites dans les paragraphes suivants.

Après l'ionisation, les ions sont ensuite dirigés *via* l'interface au moyen de gradients de tension vers l'analyseur de masse où règne un vide poussé.

Dans le cas des détecteurs TOF (Time of Flight), les ions sont ensuite séparés en fonction du temps qu'ils mettent à atteindre le détecteur. Ceci permet de dresser la distribution masse/charge de l'échantillon. Le principe de l'analyseur TOF est basé sur l'écart de temps de vol entre des ions de rapport m/z distinct mais d'énergie cinétique similaire (fixé par le potentiel qui permet son accélération au niveau de la source). Le temps nécessaire pour que

l'ion atteint le détecteur est ainsi uniquement dépendant de m/z . Plus m/z sera petit, plus la vitesse de l'ion sera grande, et inversement.

4.3.2. Les deux types de spectrométrie de masse:

4.3.2.1. Ionisation MALDI ((Matrix –Assisted Laser Desorption-Ionisation):

L'analyte à faible concentration (environ $1\mu\text{M}$) est mélangé à une matrice d'acide sinapinique (dans le cas de protéines) et déposé sur une plaque métallique. Celle-ci est placée dans le spectromètre. Sous l'effet des pulses du faisceau laser, la matrice et l'analyte qu'elle contient sont ionisés, et des ions de macromolécules sont alors transformés. Ces derniers sont ensuite analysés par mesure de temps de vol selon le principe décrit précédemment.

Cette méthode permet de contrôler la masse de la protéine et de détecter d'éventuels contaminants ou produits de dégradation.

4.3.2.2. Ionisation par electrospray:

L'échantillon, dans un solvant volatil polaire, est introduit dans une source à pression atmosphérique au moyen d'un capillaire à l'extrémité duquel est appliqué un potentiel de 3 à 4 kV. Sous l'effet d'un fort champ électrique, l'échantillon est volatilisé en un nuage de gouttes chargées dans un flux d'azote chaud, qui facilite la désolvatation des espèces chargées. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue et leur densité de charge augmente. Lorsque les répulsions électrostatiques atteignent la tension superficielle de la gouttelette, cette dernière explose en formant des gouttelettes plus petites. Ce processus est réitéré jusqu'au passage des espèces chargées en phase gazeuse (Brier 2005).

Dans le cadre de la spectrométrie electrospray, les échantillons protéiques sont tout d'abord dilués à $1\mu\text{M}$ dans une solution eau/acétonitrile ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0.2% HCOOH) avec un rapport volume/volume 1/1 afin de les dénaturer. Ils sont alors injectés à un débit de $5\mu\text{L}/\text{min}$ sous une tension de capillaire de 3kV.

Cette technique a permis d'identifier de façon précise la taille du monomère de chaque construction.

5. Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD):

5.1. Principe:

Les macromolécules biologiques possèdent toutes des carbones asymétriques, elles sont chirales. Dans la nature, les protéines sont toutes lévogyres et cette propriété leur confère une activité optique lorsqu'elles interagissent avec une lumière polarisée circulairement (Janin et al.1994).

La spectroscopie de dichroïsme circulaire permet d'obtenir une information sur la structure secondaire des protéines. En effet, des repliements en hélices α , en feuillet β ou en boucles donnent lieu à des spectres très différents dans l'UV lointain (figure.1).

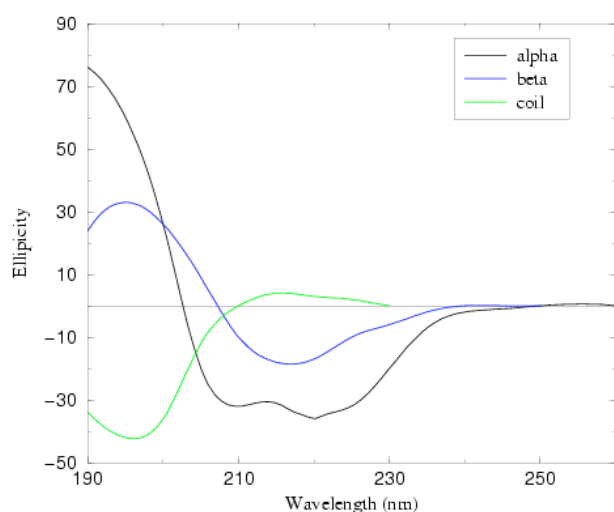


Figure.1 : Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de l'organisation en structures secondaires d'une protéine. (a) le spectre correspondant à un repliement en hélices α (noir) présente 2 minima à 208 et 220nm. (b) Le spectre correspondant à un repliement en feuillet β (bleu) présente 1 minimum vers 210-212nm. (c) spectre correspondant à une protéine mal repliée (vert). Image extraite de <http://besley.chem.nottingham.ac.uk/research/research-proteincd.html>

Deux minima à 208 et 220 nm sont en outre caractéristiques d'une seule organisation en hélices α , alors qu'un minimum unique vers 210 nm est la signature des feuillets β . Le spectre observé pour une protéine est une combinaison linéaire de ces différentes composantes selon la proportion de la protéine repliée en hélices α , feuillets β ou en boucles. Dès lors, il est à noter que le dichroïsme circulaire est beaucoup plus sensible à une organisation en hélices α ; leur contribution est susceptible de masquer des contributions venant d'autres éléments de structures secondaires.

Cette technique permet également de suivre l'évolution de la structure secondaire, lors d'une expérience de dénaturation par exemple, et ainsi de mesurer la stabilité de la protéine.

Le dichroïsme circulaire est un effet de l'activité optique qui ne dépend pas de l'orientation des molécules, la mesure peut donc se faire en solution. De plus, cette technique est rapide et requiert peu d'échantillon (200 μ L à 0,2mg/mL). L'échantillon à l'intérieur d'une cuvette en quartz (Ellma), est placé dans un faisceau de lumière polarisée droite et gauche

alternativement. Il est alors possible d'observer une différence ΔA entre l'amplitude des ondes polarisées gauches et droites, diffusées par l'échantillon (A_G et A_D respectivement) :

$$\Delta A = A_G - A_D$$

Généralement, cette différence d'absorbance ΔA est très faible. Elle est de moins de 1% de l'amplitude de l'onde électromagnétique dans l'UV lointain, domaine de longueur d'onde dans lequel on se place pour étudier la structure secondaire des protéines. Les instruments de mesure doivent donc être extrêmement précis, et la préparation des échantillons très soigneux.

En notant l le trajet optique (largeur de la cuve, en cm) et C la concentration de la protéine (en mol/L), on peut écrire

$$\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D = \Delta A / (l \times C) \text{ loi de Beer-Lambert}$$

5.2. Acquisition des données:

Après purification, la protéine se trouve dans un tampon 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl avec soit 1 mM EDTA (neck Mut) soit 4mM CaCl₂ (ECD). Or aux longueurs d'onde utilisées (en dessous de 200nm), l'absorbance du Tris-HCl est importante, ce qui perturbe l'expérience. L'échantillon est donc préalablement dilué 25 fois dans un tampon 25 mM phosphate ou acétate à une concentration d'environ 50 μ M. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 13 000 rpm durant 15 minutes pour éliminer les précipitations puis d'une mesure exacte de la concentration finale par spectrophotométrie avant de réaliser les mesures.

La cuvette utilisée est en quartz QS (Ellma): elle est transparente aux ondes électromagnétiques de longueurs d'ondes utilisées (190-250 nm).

Les spectres sont acquis sur un spectropolarimètre JASCO-810 muni d'un contrôleur de température de type Peltier à 22°C dans une cuvette de trajet optique d'1 mm.

L'ellipticité est mesurée pour une longueur d'onde incidente comprise entre 250 et 190 nm avec le tampon seul, puis avec la protéine. Le spectre caractéristique de la protéine est alors obtenu en soustrayant la composante due au tampon des valeurs expérimentales correspondant à la protéine dans son tampon. L'ellipticité $[\theta]$, mesurée par le spectropolarimètre, s'écrit:

$$[\theta] = 3300 \times \Delta \epsilon$$

L'ellipticité molaire résiduelle, qui est reportée sur les courbes de dénaturation, est alors calculée selon la relation

$$[\theta]_{MRW} = ([\theta] \times 100 \times M_r) / (c \times d \times N)$$

avec $[\theta]$: ellipticité mesurée (en degrés), M_r : poids moléculaire de la protéine (en Daltons), c : concentration de la protéine (en mg/mL), d : largeur de la cuve (en cm) et N : nombre de résidus par protéine. $[\theta]$ et $[\theta]_{MRW}$ sont donc homogènes à des degrés $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

6. Cristallogenèse:

La cristallogenèse est, bien entendu, la première étape vers la résolution de la structure d'une protéine, une fois que celle-ci est produite en grande quantité (quelques mg) et pure. Dans cette partie, nous étudierons le principe et une technique mises en œuvre afin d'obtenir ces cristaux de protéine (Ducruix et *al.* 1992).

6.1. Principe:

L'étape de cristallisation est encore peu contrôlée et est conduite de façon largement empirique.

Dans le diagramme de phase d'une protéine (figure.2), entre la zone de solubilité et la zone de précipitation, figure une étroite bande de sursaturation où la protéine peut cristalliser.

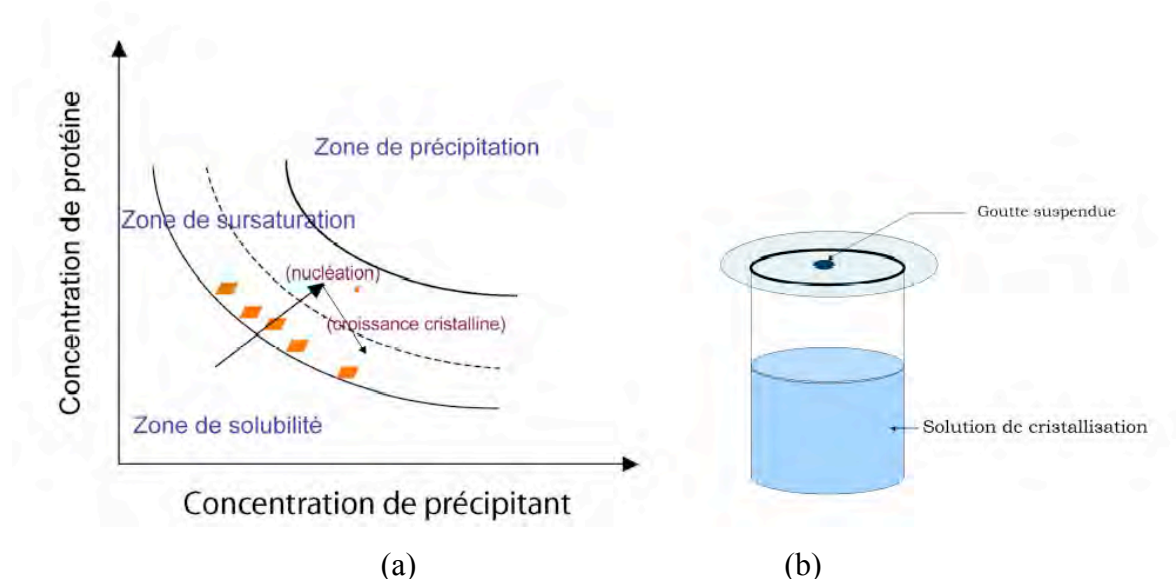


Figure.2: Processus de cristallogenèse. (a) Diagramme de phase décrivant le processus de cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur et (b) mise en œuvre expérimentale de la technique de diffusion de vapeur par goutte suspendue.

La solubilité d'une protéine dépend de nombreux paramètres comme sa concentration, le pH, la température, la présence d'agents précipitants (notamment le PEG et /ou des sels chaotropiques à haute concentration) ou solubilisants (sels à basse concentration par

exemple). L'aspect cinétique est lui aussi important. Le travail de cristallogenèse consiste à modifier ces différents paramètres afin que la protéine cristallise.

La sursaturation, rapport entre la concentration initiale en soluté/protéine et la concentration à l'équilibre, est la force motrice des processus de nucléation et la croissance cristalline.

La première étape de la cristallisation consiste à rendre les protéines insolubles suite à l'ajout d'agents précipitants afin d'amener les protéines dans la partie métastable de la zone de sursaturation où les nuclei ou précipités cristallins se forment. Suite à cela la sursaturation des protéines dans le reste de la goutte de cristallisation diminue, ce qui permet de repasser dans le domaine de sursaturation propice à la croissance cristalline. Cette dernière se poursuit alors autour des nuclei formés précédemment et la taille des cristaux augmente, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéines disponibles dans la goutte ou que la croissance cristalline soit interrompue suite à des nombreux défauts de cristallisation (irrégularités dans la maille, addition de molécules légèrement différentes).

6.2. Mise en œuvre:

Pour cela, la technique la plus couramment utilisée au laboratoire est la méthode par diffusion de vapeur en goutte suspendu (McPherson et *al.* 1995, Ducruix et *al.* 1992). Elle consiste en la diffusion de vapeur entre une goutte de solution protéique mélangée à la solution de cristallisation et un réservoir de solution de cristallisation qui est un mélange d'agents précipitant et solubilisant, et ce jusqu'à ce que les potentiels chimiques de la goutte et du puits s'équilibrent.

Pour cela, une goutte d'1 μ L de solution de protéine est déposée sur une lamelle de verre siliconé et 1 μ L de solution de cristallisation du puits lui est ajouté. La lamelle de verre vient fermer un puits dans lequel 1ml ou 0,5ml de solution de réservoir a été déposé, l'étanchéité est assurée par de la graisse de silicone déposée entre la lamelle et le dessus du puits (figure.2-b)

Pendant que les potentiels chimiques s'équilibrent, le volume de la goutte suspendue peut diminuer ou augmenter. Quand il diminue, il s'en suit une augmentation de la concentration de protéine et de sels dans la goutte, et dans le diagramme de phase la protéine est alors dans le domaine de sursaturation ou de précipitation. C'est là que les germes cristallins apparaissent. Puis le processus de croissance cristalline se poursuit, comme décrit précédemment (figure.2-a).

Les cristaux obtenus ont été testés sur la ligne ID12 avec l'aide d'Aurélien Deniaud pour l'analyse des clichés de diffraction.

7. Technologie BIAcore (SPR):

7.1. Généralité:

Le biocapteur BIAcore correspond à la technologie actuellement la plus utilisée pour l'analyse des interactions biospécifiques. La mesure repose sur un principe optique, la résonance plasmonique de surface (SPR, pour Surface Plasmon Resonance, Löfås & Johnsson 1990, Jonsson et al. 1991). Elle permet le suivi en temps réel d'interactions moléculaires sur une phase solide parcourue par un débit constant de solution. Elle n'implique pas de marquage des réactifs. Les appareils utilisés pour cette étude sont complètement automatisés, ce qui permet une gestion très aisée des protocoles, une haute fréquence d'échantillonnage sans perturber la réaction, et une interface immédiate avec les logiciels de traitement de données.

7.2. Le système de mesures:

Le système de mesure est composé de trois éléments (figure.3):

**La sensor chip* : La surface biospécifique est appelée sensor chip. Elle consiste le plus souvent en un support de verre, recouvert d'une fine couche d'or, sur laquelle est greffée un hydrogel non-réticulé de carboxyméthyl dextran d'une épaisseur de 100nm. Sur ce gel, la première molécule dite ligand sera immobilisée de façon covalente en faisant recours à diverses chimies de couplage. Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique.

**La micro-plaquette fluidique* : Elle contrôle l'injection (de 5 à 300 microlitres) et le débit (de 1 à 100 microlitres/mn) des réactifs à la surface du sensor chip.

**lumière monochromatique et prisme* : L'autre face de la chip (du côté du verre) est illuminée par un faisceau monochromatique polarisé, focalisé par un prisme.

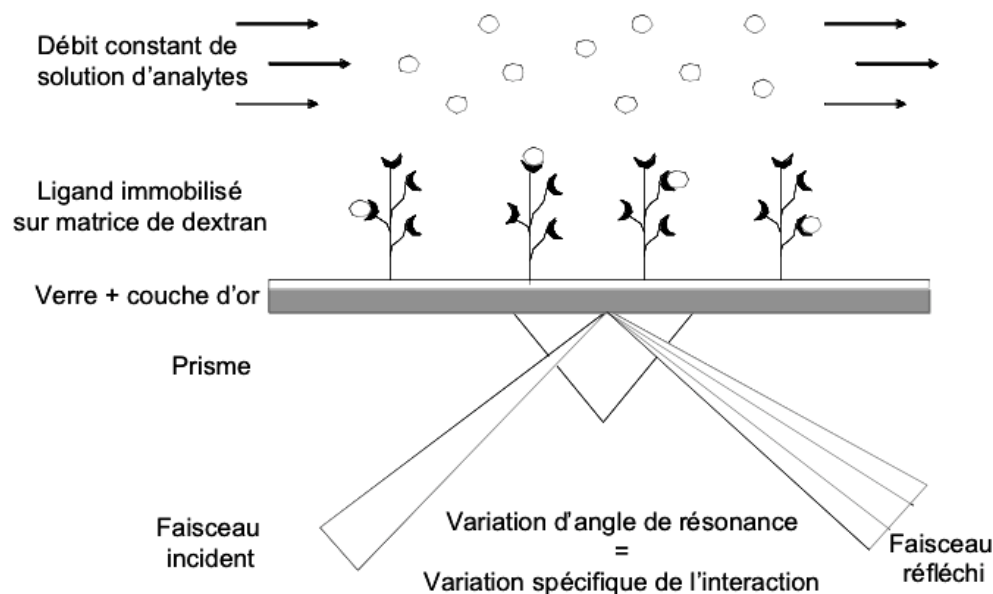


Figure.3: Schéma représentant le principe de la technologie SPR BIAcore pour l'étude des interactions biomoléculaires.

7.3. Principe physique:

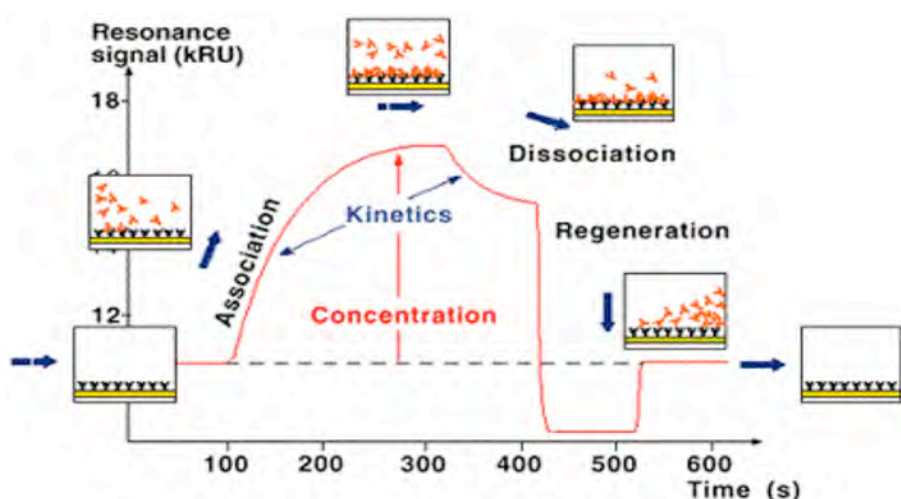
Afin d'obtenir un phénomène de résonance plasmonique de surface, il faut se mettre dans une condition de réflexion interne totale. Cela veut dire que le faisceau monochromatique polarisé doit heurter la surface en verre avec un angle d'incidence donné, de telle façon que la différence des indices de réfraction de part et d'autre de la surface provoque sa réflexion totale (figure.3). Dans ces conditions, le phénomène de résonance plasmonique de surface est observé et correspond à la résonance avec les électrons libres (plasmons) de la couche d'or, de l'onde évanescente provoquée par le faisceau incident. Ceci se propage vers le milieu réactionnel, perpendiculairement à la surface, et jusqu'à une profondeur correspondant à sa longueur d'onde (760 nm). Une baisse d'intensité du faisceau réfléchi est alors provoquée à un angle défini. Cet angle dépend de la différence des indices de réfraction. Plus la différence entre les indices de réfraction est importante plus l'angle du faisceau réfléchi est important (Jonsson et *al.* 1991).

7.4. L'application du principe de la SPR pour l'étude des interactions biomoléculaires:

Un faisceau incident de lumière monochromatique polarisé est fixé sur une surface de verre recouverte d'un film d'or (sensor chip le plus simple). L'angle d'incidence choisi

provoque une réflexion totale de la lumière incidente, permettant à l'onde évanescente provenant du faisceau incident d'entrer en résonance avec les électrons libres de la couche d'or. Ce phénomène se manifeste au niveau du faisceau réfléchi par une baisse d'intensité à un angle précis. La modification de l'indice de réfraction du milieu à la surface de la chip, suite à la liaison de l'analyte avec le ligand immobilisé, provoque une variation de cet angle, qui constitue donc le signal spécifique de l'interaction moléculaire. Cette variation d'angle est proportionnelle à une variation de masse dans le domaine expérimental étudié (d'après O'Shannessy 1994, Malmqvist 1994, Granzow 1994).

A-



B-

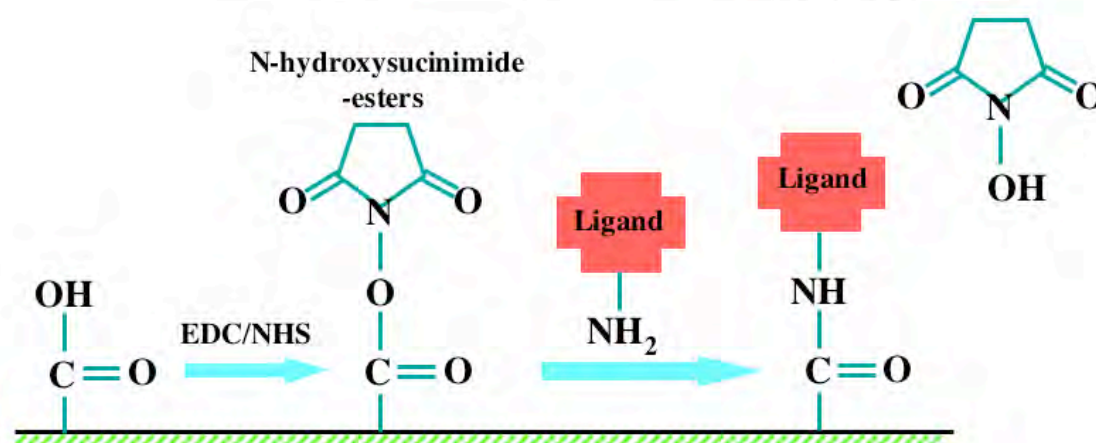


Figure.4: (A) Profil d'un sensorgramme obtenue par technologie SPR BIAcore lors d'une étude d'interaction ligand-analyte avec une phase d'association, de dissociation et de régénération. (B) mécanisme de couplage chimique EDC/NHS qui permet d'obtenir un produit intermédiaire réactif, le N-Hydroxysuccinique-ester, associé au groupe carboxylique de la piste. Cet intermédiaire va interagir avec le NH₂ d'un ligand et l'immobilise ainsi d'une façon covalente sur la piste grâce à la liaison amide établie.

Le signal obtenu en suivant les variations de cet angle de résonance est quantifié en unités arbitraires (RU, pour resonance units). Un signal de 1000 RU correspond à une variation d'angle de 10^{-4} degré, et à une augmentation de la concentration surfacique de 1 ng de protéine par mm^2 (la surface réfractive est de $1,1 \text{ mm}^2$). La présentation de ce signal en fonction du temps constitue un jeu de données cinétiques appelé « sensorgramme ».

Les phases observées sur un sensorgramme tout en supposant que la protéine ligand A soit immobilisée sur un support (chip) et que l'analyte B passe dans le tampon de course, sont au nombre de trois (figure.4-A):

1 - Phase d'adsorption: un tampon circule en flux continu à sa surface. Dans ce tampon se trouve l'analyte B qui interagit avec la protéine A.

2 - Phase de désorption: un tampon n'incluant pas B est injecté, conduisant à une dissociation progressive des complexes AB formés.

3 - Phase de régénération: la dissociation est brutalement accélérée, aboutissant à une surface vierge de B, comme au début de l'expérience.

[7.5. La technique d'immobilisation utilisée pour les pistes orientées et non orientées:](#)

Dans le cadre de mon travail, j'ai eu recours à des pistes comportant des groupes carboxyles libres (piste CM4 pour une immobilisation de densité moyenne ou piste CM5 pour une immobilisation de haute densité). Cette étape d'immobilisation suit un protocole standard où tous les réactifs ou protéines sont injectés à un débit de $5 \mu\text{L}/\text{min}$.

Les molécules chimiques ou protéiques seront ainsi fixées à la piste dextran en les couplant grâce au mélange EDC/NHS (50:50) au groupement carboxylique présent sur la piste ($50 \mu\text{L}$ injectés) (figure.4-B). Afin d'éviter une répulsion électrostatique avec la surface négative de la chip et permettre la chimie de couplage, la protéine devrait être injectée dans un tampon ayant un pH inférieur à son point isoélectrique. La quantité de protéine injectée ne dépend que de la densité de protéine souhaitée sur chacune des pistes. Afin de bloquer les sites réactifs restants sur la piste suite à l'injection de la protéine, $30 \mu\text{L}$ d'éthanolamine sont injectés. Pour éliminer les molécules interagissant d'une façon non-spécifique et non-covalente avec la piste, une injection de $10 \mu\text{L}$ de HCl 10 mM est réalisée. La densité de protéine immobilisée sur la piste est notée par Rug (RU de greffe).

Dans le cas d'une piste non orientée, c'est-à-dire où la protéine se fixe de façon covalente et sans un sens d'orientation privilégiée, la protéine d'intérêt est directement immobilisée sur la piste.

Dans le cas d'une piste de protéine orientée, on procède à une fonctionnalisation par capture. En effet, une piste sera préparée de manière à pouvoir fixer en deuxième temps une protéine par son étiquette.

7.6. Mise en œuvre:

Deux types d'expérience sont réalisés :

- Les tests d'inhibition : il consiste à immobiliser d'une façon orientée ou non une structure glycosylée (BSA-Man ou gp120) sur une piste, puis d'injecter dans le tampon de course une concentration constante de DC-SIGN EC en présence d'une gamme de concentration de molécules actives ou témoins.
- Les tests d'interaction directe : il consiste à immobiliser d'une façon orientée ou non un composé sucré à tester et d'injecter une gamme de concentration de la lectine DC-SIGN EC dans le tampon de course.

8. Ultracentrifugation analytique (AUC):

Cette technique permet de caractériser les interactions des macromolécules en solution, en observant les répartitions, lorsqu'elles sont soumises à un champ de force centrifuge très important (jusqu'à 300 000g).

C'est ainsi que l'on peut quantifier :

- L'homogénéité des préparations
- La forme globale et la masse des macromolécules
- Les constantes d'association
- La stoechiométrie de systèmes complexes à plusieurs composants (protéine- détergent, protéine- sucre, protéine- ARN, protéine polymère, solvation...), Grâce à la sensibilité de l'AUC à la densité des particules.

Ces mesures sont effectuées à une longueur d'onde donnée, et permettent d'obtenir l'absorbance de l'échantillon en fonction de distance à l'axe de rotation. Ainsi, on obtient la répartition des macromolécules (exprimée en absorbance) dans la cellule de centrifugation en fonction de la distance radiale et éventuellement du temps.

8.1. Instrumentation:

Cet appareil est une centrifugeuse dans laquelle vient se fixer un bras optique, afin de faire passer, à travers les échantillons, les rayons lumineux nécessaires pour l'acquisition des

données. Lors de la centrifugation, l'enceinte de la centrifugeuse est sous vide. Ce vide est nécessaire afin d'éviter tout frottement entre l'air et le rotor, ce qui engendrerait un échauffement de celui-ci.

Comme pour toute centrifugeuse, un rotor est utilisé, dans lequel se positionnent des cellules. Ces cellules sont composées de cylindres, dans lesquelles on place une pièce centrale, à 2, 6 ou 8 canaux, situés entre deux fenêtres de quartz ou de saphir. Elles sont étanches et résistent aux importantes contraintes mécaniques auxquelles elles seront soumises.

8.2. La détection:

Il existe deux types de détection, celle en absorbance et celle en interférence :

a) La détection en absorbance : Un bras automatique permet d'illuminer, par des flashes de lumière monochromatique synchronisés avec la rotation du rotor, les compartiments référence et échantillon. Au cours de la centrifugation et à une longueur d'onde donnée, les intensités transmises seront mesurées aux différentes positions de la cellule (figure.5).

Il existe un lien entre les intensités et l'absorbance des échantillons, c'est l'équation suivante :

$$A = -\log (I_{\text{échantillon}} / I_{\text{solvant}})$$

C'est ainsi, qu'à partir des intensités obtenues et de l'équation, on peut déterminer l'absorbance de l'échantillon en fonction de la distance à l'axe de rotation.

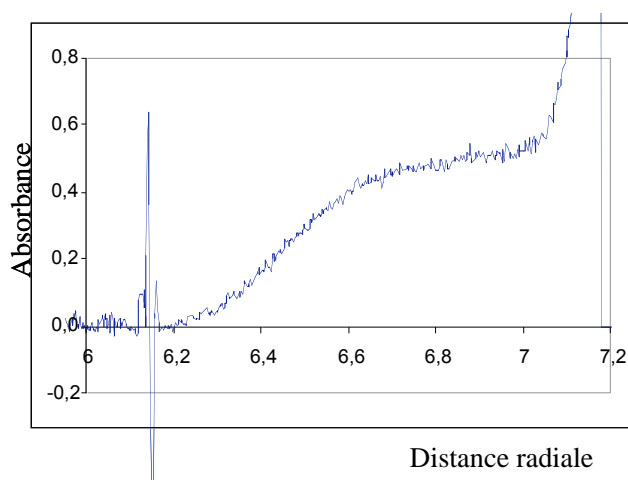


Figure.5: Graphique représentant l'absorbance de l'échantillon en fonction de la distance de l'axe de rotation

b) La détection en interférence : Un laser, composé d'une lumière monochromatique cohérente, est utilisé pour illuminer les deux compartiments à la fois. Cela permet d'obtenir des franges d'interférence en fonction de la position radiale dans la cellule (figure.6). Il y a

déplacement de ces franges lorsque la concentration en macromolécule varie (l'indice de réfraction augmente dans le compartiment échantillon par rapport au compartiment référence).

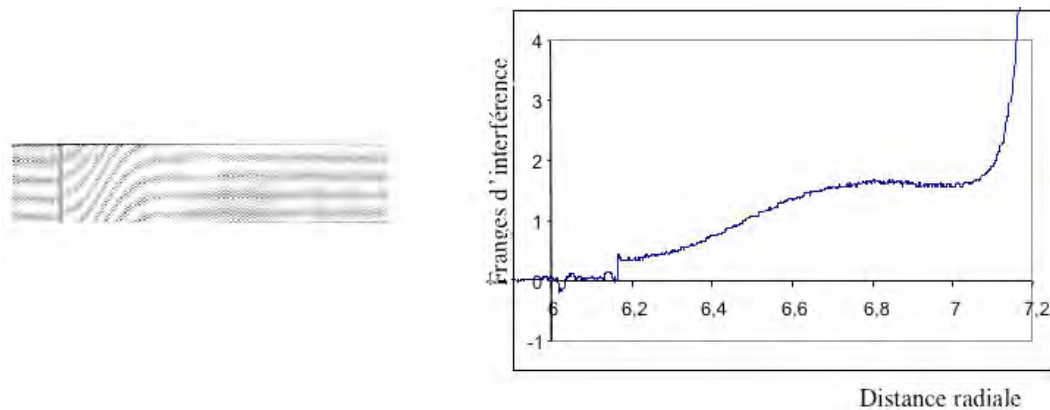


Figure.6: (A gauche): Représentation des compartiments échantillon (en haut) et solvant (au centre) et des franges d'interférence (en bas); (A droite): Graphique représentant les déplacements de franges d'interférence en fonction de la différence radiale.

8.3. Le type d'études:

Il existe deux types principaux d'étude de sédimentation : les équilibres de sédimentation et les vitesses de sédimentation. Je ne présente ici que les expériences en vitesse de sédimentation que j'ai abordées.

Cette expérience s'effectue à grande vitesse (en fonction de la capacité des macromolécules à sédimenter) et avec un volume de 420 μ l. On peut ainsi déterminer un certain nombre de paramètres hydrodynamiques des protéines, comme les coefficients de sédimentation, de diffusion et de friction reliés à la forme. Lorsque l'on centrifuge une macromolécule, celle-ci est entraînée vers l'extérieur de la cellule. On observe donc, à différents temps, l'absorbance en fonction de la distance à l'axe de rotation (figure.7). En réalité, Il y a formation d'un front, qui se déplace vers le fond de la cellule. La position de ce front, en fonction du temps, permet de déterminer le coefficient de sédimentation (s). Ce coefficient correspond au rapport entre vitesse de particule et l'accélération due à la force centrifuge.

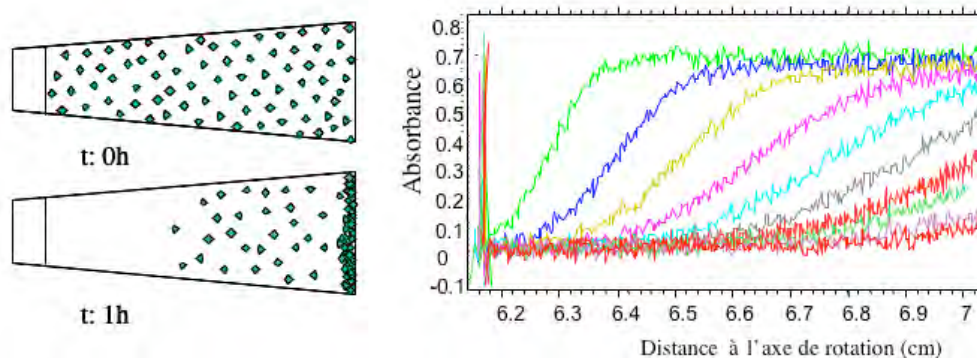


Figure.7: (A gauche): Représentation d'un échantillon t=0h et t=1h ; (A droite): Graphique représentant les fronts d'absorbance en fonction de la différence radiale pour le compartiment échantillon à un temps compris entre 0 et 1h.

8.4. La théorie physique:

8.4.1. Le calcul du coefficient de sédimentation (pour un soluté idéal):

Le déplacement d'une macromolécule de masse « m » lors de l'application d'une force centrifuge au sein d'un liquide sera freiné par la force de friction et la poussée d'Archimède.

- La force centrifuge : $F_c = m \omega^2 r$
- La "poussée d'Archimède" : $F_A = m_0 \omega^2 r$
- La force de friction : $F_f = -f \cdot v$

Où ω : vitesse angulaire ; r : distance à l'axe de rotation ; f : coefficient de friction ; v : vitesse de la macromolécule ; m_0 : masse du solvant déplacé.

La masse de la macromolécule $m = M/N_A$ avec M : masse molaire (g/mol); N_A : nombre d'Avogadro (mol^{-1}) alors que la masse du solvant déplacé :

$$m_0 = V \cdot \rho = m \cdot \bar{V} \cdot \rho = (M/N_A) \cdot \bar{V} \cdot \rho$$

avec V : volume de la particule ; ρ : densité du solvant ; \bar{V} : volume partiel spécifique (volume par gramme) de la macromolécule.

Après un temps très court: $F_c + F_A + F_f = 0$ ce qui donne : $\omega^2 r \cdot (M/N_A) \cdot (1 - \bar{V} \rho) - f \cdot v = 0$. À partir de cela on arrive à calculer le coefficient de sédimentation qui est égal à la vitesse de la macromolécule par unité de champ centrifuge. Le coefficient de sédimentation est exprimé en unité Svedberg où $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$:

$$S = v / \omega^2 r = M \cdot (1 - \bar{V} \rho) / (N_A \cdot f)$$

Cette formule établit une relation entre le coefficient de sédimentation d'une part et la masse, la composition, la forme de la macromolécule, la densité et la viscosité du solvant d'autre part.

8.4.2. La normalisation du coefficient de sédimentation:

Afin d'avoir des résultats comparables pour des macromolécules ayant migré dans différents tampons, il a fallu définir un tampon de référence par rapport auquel tout pourra être normalisé. Le tampon qui a été choisit est l'eau. Sachant que η est la viscosité de la solution, la formule de normalisation du coefficient de sédimentation est la suivante :

$$s_{20,w} = S_{exp} \cdot ((1 - \bar{V} \rho_{20,w}) / (1 - \bar{V} \rho_{exp})) \cdot (\eta_{exp} / \eta_{20,w})$$

8.4.3. Relations entre f, R_H et D et leur modélisation:

Grâce à la loi de Stokes, une relation est établie entre la viscosité de la solution « η » et le rayon de Stokes qui n'est autre que le rayon hydrodynamique (R_H) de la molécule. Le R_H est en réalité le rayon d'une sphère qui aurait un comportement hydrodynamique équivalent. R_H et η ont pu être rattaché au coefficient de diffusion D (en m²/s) à travers la loi d'Einstein-Stokes. R et T sont respectivement la constante des gaz parfaits et la température (K).

Loi de Stokes:	$f = 6 \pi \eta R_H$
Loi d'Einstein-Stokes:	$D = RT / N_A \cdot f$

Pour réaliser la modélisation de f, R_H ou D, il faut au départ calculer R_0 , f_0 , D_0 correspondant à une particule de même volume, sphérique et non hydratée. Les rapports $R_H/R_0 = f/f_0 = D_0/D$ dépendent de la forme et de l'hydratation de la macromolécule. À titre d'exemple, pour une macromolécule globulaire compacte le rapport f/f_0 est de 1.25.

8.4.4. Équation de Lamm :

L'équation de Lamm établit une relation entre les phénomènes de diffusion et de sédimentation pour une macromolécule en migration au sein d'un liquide sous une force centrifuge. En réalité, cette équation démontre que le transport des macromolécules dépend de

leur coefficient de sédimentation (liés à M et v), de leur coefficient de diffusion D, et dans le cas de systèmes en interaction de leurs vitesses de formation et disparition.

$$J = c s \omega^2 r - D \cdot \partial c / \partial r = \text{flux}$$

Avec D=Coefficient de diffusion, $\partial c / \partial r$ = gradient de concentration

8.4.5. Vitesse de sédimentation: le transport est dominé par la sédimentation

L'équation de Lamm rend compte de l'élargissement du front lié à la diffusion de la macromolécule et aux réactions. Elle ne peut se résoudre que de manière approchée, même dans les cas les plus simples. Des solutions approchées ne considèrent pas l'accumulation de matériel au fond de la cellule, ou la restriction de la diffusion au niveau du ménisque.

8.4.6. Position du front:

Il existe deux cas pour l'analyse du front de sédimentation « r ». Cela peut se faire soit en observant le point d'inflexion du profil de sédimentation (si le phénomène de la diffusion est négligé), soit en prenant compte de la position du second moment (si le phénomène de diffusion est pris en compte dans le cas d'une analyse de la solution exacte). L'équation qui établit le lien entre tous ces éléments est la suivante :

$$s = \partial r / \partial t / \omega^2 r = 1 / \omega^2 \cdot \partial \text{Log } r / \partial t \text{ avec } \text{Log } r = s \omega^2 t + \text{constante}$$

8.5. Analyse du profil de sédimentation:

Différents logiciels permettent d'analyser simultanément plusieurs profils de sédimentation dans leur ensemble (DCDT, Sedfit, ultrascan...). Dans ce travail, nous avons utilisé le programme Sedfit de Peter Schuck qui modélise beaucoup plus exactement les solutions de l'équation de Lamm. Il utilise des solutions numériques de l'équation du transport. Il permet de caractériser des distributions de coefficients de sédimentation de manière extrêmement résolutive, en fixant des relations plausibles entre masse et taille de la macromolécule, puis, dans le cas de systèmes sans interaction, de caractériser s et D, donc M, à partir des données expérimentales.

8.6. Mise en oeuvre:

Les expériences de vitesse de sédimentation sont réalisées dans une machine d'ultracentrifugation analytique type Beckman XL-1 utilisant le rotor AN-60 TI (Beckman instruments), à 20°C. Les échantillons sont manipulés dans des tampons à un pH donné. La masse molaire et le volume partiel spécifique de DC-SIGN EC/Neck sont estimés à partir de la composition en acides aminés en utilisant le logiciel Sednterp (www.bbi.org/RASMB/rasmb.html)

Les expériences de vitesse de sédimentation sont réalisées à 42 000rpm, en utilisant 400µL d'échantillon de protéine déposé dans une pièce centrale à 2 canaux de 1,2 cm de largeur situés entre deux fenêtres de saphir, et suivies à 5 minutes d'intervalle par des spectres en utilisant des optiques d'absorbance et d'interférence.

Les spectres d'absorbance sont enregistrés sur la nuit à 280 nm. Les profils de sédimentation sont analysés en utilisant le logiciel Sedfit (version 9.2 développé par Schuck et téléchargeable sur le site :<http://analyticalultracentrifugation.com>) offrant une distribution continue du coefficient de sédimentations apparent, $C(s)$ (Schuck et *al.* 2000). Typiquement, vingt profils de migration espacés d'un intervalle fixe obtenu pour une durée totale de 6h sont globalement modélisés. L'analyse de la distribution continue du coefficient de sédimentation apparent ($C(s)$) a été réalisée en considérant 200 particules sur un graphe de 300 points radiaux, calculée avec un coefficient de friction f/f° adéquat au tampon utilisé (ajusté dans Sedfit et correspondant à une forme très allongée comme cela a été démontré pour DC-SIGN EC (Feinberg et *al.* 2005)). Pour le processus de régularisation, le niveau de confiance a été fixé à 0.7.

9. La technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS):

La diffusion des rayons X aux petits angles est fréquemment utilisée pour caractériser la structure et l'interaction des macromolécules biologiques et de leur complexe en solution. Même si c'est une technique à basse résolution, l'avantage du grand flux de la source synchrotron et du traitement du profil 1D de diffusion de lumière a rendu possible l'accès à des modèles moléculaires à basse résolution à partir des données de SAXS. De plus, la technique SAXS est bien adaptée à l'étude d'une ensemble semi ou complètement dénaturé en fonction du temps ou des conditions du milieu.

9.1. Introduction de la technique SAXS:

La technique SAXS permet d'étudier la structure et les interactions biologiques des macromolécules en solution. Elle permet de modéliser des protéines, des acides nucléiques et leurs complexes dans des conditions physiologiques ou dénaturantes, sans passer par un stade de cristallisation et sans limitation à un poids moléculaire défini comme dans le cas de la spectroscopie RMN. Le développement des sources puissantes des rayons X de 3^{ème} génération, des détecteurs hautement sensibles et des algorithmes sophistiqués pour analyser les données obtenues ont fait de la technique SAXS un outil indispensable pour les applications biologiques. L'augmentation de l'intérêt dans la technique SAXS dans les applications structurales est reflétée par le nombre de publication associées à la technique SAXS dont l'utilisation a été multipliée par 3 depuis la dernière décennie (Lipfert et Doniach 2007).

Le principe de base du SAXS est de diffuser les photons des rayons X d'une façon élastique sur des molécules en solution, et d'enregistrer l'intensité de diffusion en fonction de l'angle de diffusion.

Historiquement, le SAXS a été utilisé pour obtenir une petite poignée de paramètres comme des poids moléculaires M_w , des rayons de gyration R_g et la distance maximale intermoléculaire D_{max} (Glatter et *al.* 1992 ; Guinier et *al.* 1939). De nos jours, le développement d'algorithmes qui permettent la reconstitution *ab-initio* d'un modèle 3D à basse résolution d'une carte de densité électronique à partir d'un profil de diffusion 1D, permet d'acquérir des informations plus importantes que simplement le R_g de la protéine. Récemment, Svergun et ses collaborateurs ont créé des outils de modélisation moléculaire pour les données SAXS si les structures du composant individuel sont partiellement identifiées par des expériences à haute résolution.

9.2. La reconstitution 3D

Les paramètres qui sont fréquemment extraits des profils SAXS pour des biomolécules en solution (qui sont suffisamment diluées pour éviter les effets des interactions inter-particulaires) sont le R_g et l'intensité de diffusion $I(0)$. Ils sont obtenus par la formule de Guinier : $I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3)$, pour les petits moments de transfert q ($q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$, où 2θ est l'angle totale de diffusion et λ la longueur d'onde des rayons X), en traçant $\ln(I(q))$ en fonction de q^2 et en modélisant la courbe et ses points d'intersections. Le R_g caractérise le

volume moléculaire sans réaliser une modélisation et $I(0)$ peut être associé au poids moléculaire à travers la relation suivants :

$$I(0) = \chi C (\Delta\rho)^2 (MW)^2$$

où χ est la constante de proportionnalité qui peut être déterminée par des mesures de poids moléculaire standard (exemple une protéine de poids moléculaire de concentration connus), C , la concentration de la macromolécule, $\Delta\rho$ c'est la moyenne de densité électronique de contraste de la molécule, et Mw le poids moléculaire. Plus généralement, le profil de diffusion peut être écrit sous forme de fonction de distribution de la distance intramoléculaire $\rho(r)$ (D_{max} c'est la distance intramoléculaire maximale entre 2 molécules en solution) :

$$I(q) = \int_0^{D_{max}} dr \rho(r) (\sin(qr)/qr)$$

$\rho(r)$ peut être obtenu de la transformation indirecte de Fourier du profil de diffusion en utilisant le logiciel GNOM développé par Svergun (Svergun et *al.* 1992). Cependant, récemment, l'utilisation de $\rho(r)$ pour visualiser l'enveloppe moléculaire a été dépassée par l'algorithme qui fournit une carte de densité électronique 3D à basse résolution de la molécule à partir d'un profil de SAXS 1D.

9.3. Détermination de la forme moléculaire *ab initio* :

En appliquant la loi de la contrainte physique où une biomolécule dispose en général, d'une unique répartition de la densité électronique, Stuthrmann a traduit le profil de diffusion dans des termes d'harmoniques sphériques réparties sur toute la surface de la molécule. La détermination du coefficient d'harmonique sphérique par un ajustement « fitting » non linéaire des données, a conduit à la détermination *ab-initio* de la surface moléculaire. Cependant, en pratique, cela limite la forme qui peut être considérée pour des molécules proches en forme à une sphère déformée. Ainsi des molécules avec de multiples domaines et/ou cavités ne peuvent être représentées par une simple expansion d'harmoniques sphériques (Svergun et *al.* 1991).

En 1998, Chacon et ses collaborateurs ont prouvé que les modèles, où la densité électronique moléculaire est approximative en terme d'assemblage des billes « beads » ou « dummy atoms » (représentés comme des points de diffusion), peuvent être utilisés pour ajusté conformément aux données de diffusion. Svergun et ses collaborateurs ont développé le logiciel DAMMIN (Svergun et *al.* 1999), un programme de modélisation qui se base sur des critères de compaction des structures, et GASBOR (Petoukhov et *al.* 2003, Svergun et *al.*

1994), un programme qui affine d'avantage le travail de DAMMIN en accédant à la reconstruction de la protéine. (<http://www.embl-hamburg.de/externalinfo/research/sax/software.html>).

Cependant la reconstruction 3-D à partir des données de diffusion 1D n'est pas unique. En réalité, l'obtention de plusieurs modèles 3D (appelés partenaires structuraux) est fréquente, et cela est dû au manque d'informations sur la phase et l'orientation angulaire lors de mesures SAXS. Les partenaires structuraux sont des solutions de « bead-model » ou modèle à pseudo-atomes avec différentes géométries qui donnent approximativement la même $I(q)$ en solution. Ces partenaires sont fréquemment obtenues pour des molécules ayant une forme hautement symétrique (comme dans le cas d'un cylindre). En pratique, il est avantageux de comparer et de moyenner les résultats de différentes reconstructions réalisées afin d'obtenir l'enveloppe moléculaire la plus probable. Svergun et ses collaborateurs ont créé un logiciel qui compare les modèles sur une base de normalisation spatiale et qui est capable de calculer une forme moyenne.

9.4. L'appareillage et les conditions expérimentales:

Les différentes collectes des données SAXS réalisées au cours de ce travail ont été effectuées à l'aide de deux types d'équipement :

a) Un appareil de laboratoire: Le montage expérimental est celui d'un appareil du laboratoire, Nanostar Small Angle X-Ray Scattering camera (Pederson et al. 2004). Un générateur à anode tournante au cuivre est à l'origine de l'émission des rayons X. Le système optique comporte des miroirs Göbel (pour émettre la lumière parallèlement à la surface) suivis par un système de trois collimateurs responsable de la focalisation et la réduction du flux de la lumière émise ($\text{Flux} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ photons.s}^{-1}$). Les spectres sont enregistrés sur un détecteur bidimensionnel à gaz (figure.8).

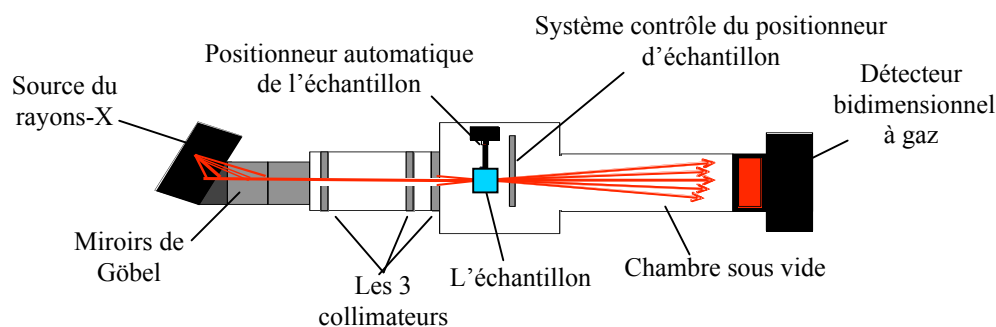


Figure.8: Montage de l'appareil NanoStar small-angle X-Ray scattering.

Le synchrotron: Un synchrotron est un équipement permettant d'accélérer des électrons, à de hautes énergies. Les particules sont guidées par un champ magnétique variable en même temps qu'elles sont accélérées un grand nombre de fois le long d'une trajectoire circulaire par un champ électrique à haute fréquence. Ce mouvement accéléré des particules émet des rayons X qui se heurtent à un système optique qui focalise la lumière sur un monochromateur. La lumière polarisée est alors projetée sur l'échantillon à étudier qui finira par atteindre un détecteur associé à un système informatique recueillant les données de diffusion de lumière à travers l'échantillon (figure.9).

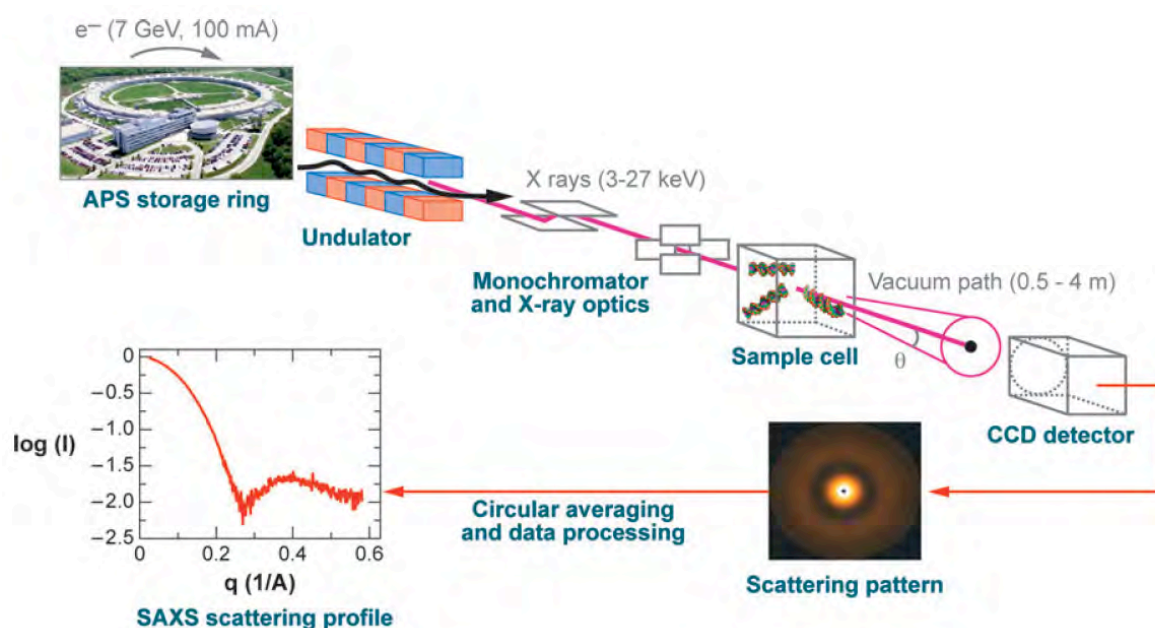


Figure.9: Schéma représentant l'appareillage au synchrotron utilisé dans les études SAXS.

9.5. Conditions expérimentales et traitements réalisés:

Pour chaque expérience, un volume de 50 μL d'échantillon est utilisé. Le spectre de la solution tampon correspondante est également enregistré dans les mêmes conditions à 4°C. La durée totale d'enregistrement est de 2 h (sur un appareil de laboratoire). Un problème de modification de la solution de protéine par l'irradiation aux rayons X peut se poser (le faisceau traversant l'échantillon protéique, pourra induire l'apparition des charges au niveau des protéines, par conséquent conduire à un phénomène d'aggrégation entre les protéines au niveau de l'échantillon irradié). Pour contrôler ce phénomène, 10 spectres consécutifs de 100 secondes d'exposition ont été enregistrés sur le même échantillon, puis moyennés après

vérification d'absence de modification de spectre. Toutes les séries de spectres à différentes concentrations de DC-SIGN EC (1mg/mL, 2,8 mg/mL et 7,8 mg/ml) et distances échantillon-détecteur (1 à 3 m) sont normalisées pour tenir compte de la réponse du détecteur, de l'intensité transmise du faisceau et du temps d'acquisition. Enfin, la contribution du solvant est soustraite du spectre. Toutes ces étapes sont réalisées à l'aide du logiciel PRIMUS (Koranev et al. 2003). Les courbes issues de ces traitements sont celles des $I(q)/c$ en fonction de q où c est la concentration en DC-SIGN, q le module vecteur de diffusion des rayons-X et $I(q)$, l'intensité de ce dernier. Après la reconstruction de la courbe, l'analyse du spectre SAXS à l'aide du logiciel PRIMUS permet de calculer le R_g (rayon de gyration) selon la loi de Guinier (Guinier et al. 1955). En utilisant le programme GNOM (Svergun et al. 1992), la fonction de distribution des distances inter-atomiques $P(r)$ est calculée à partir d'une estimation de D_{\max} (la dimension maximale de la particule diffusante). En effet, ce D_{\max} a été choisi de façon à faire atterrir la courbe de $P(r)$ sur l'axe des abscisses avec la pente la plus faible possible. La valeur de D_{\max} est déterminée par le point où la courbe $P(r)$ intercepte l'axe des abscisses.

Les programmes utilisés dans la détermination de la forme (calculs *ab initio*) sont nommés DAMMIN et GASBOR (Svergun et al. 1999), décrivent la protéine comme un ensemble de pseudo-atomes de densité uniforme empilés sous contraintes et d'une manière dense sur un réseau, et remplissant initialement une sphère de diamètre D_{\max} (Svergun et al. 2001). Une étape plus poussée de traitement, réalisée par le même logiciel, va permettre de remonter à la structure de l'enveloppe moléculaire de DC-SIGN EC. Elle consiste à éliminer les pseudo-atomes qui n'appartiennent pas à la protéine au sein de cette sphère D_{\max} et cela en ajustant par itération successive l'intensité diffusée calculée à la courbe expérimentale. Ce type d'analyse conduit à l'émergence d'un ensemble des configurations, qui toutefois possèdent des caractéristiques communes.

BUT DU TRAVAIL
ET
CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Compte tenu du rôle central de la lectine DC-SIGN dans le détournement du système immunitaire par toute une série de pathogène, ce récepteur est devenu une cible d'intérêt thérapeutique de premier plan. Au démarrage de ce travail, il était clair que la nature oligomérique de ce récepteur était au centre de ses propriétés de reconnaissance de pathogènes. La structure du domaine CRD de DC-SIGN était connue, mais très peu de données sur le récepteur dans sa version oligomérique étaient disponibles. Trois objectifs complémentaires majeurs (défini en axes de travail) ont orienté ce travail :

Axe1 : Le développement de molécule ligand, inhibiteurs potentiel, prenant en compte la dimension oligomérique de DC-SIGN.

Axe 2 : Caractériser l'organisation tétramérique de DC-SIGN, centrale dans la reconnaissance de pathogènes.

Axe 3 : Etudier les propriétés biochimiques de ce récepteur en relation avec son fonctionnement au niveau cellulaire (interaction, internalisation...).

Pour mener à bien ces différents objectifs, ce travail a été réalisé en collaboration avec plusieurs laboratoires. Le rôle respectif global de chaque partenaire est présenté ci-dessous.

a) Développement d'inhibiteurs (Axe1): La stratégie instaurée visait à élaborer des inhibiteurs multivalents de DC-SIGN dans le cadre de collaborations européennes avec des équipes de chimistes. Cet axe de travail implique :

- Une première équipe de chimiste de Séville (Espagne), sous la direction de Javier Rojo, est spécialisée dans la chimie des dendrimères et fortement impliquée dans l'élaboration de stratégie de production des différents glycodendrimères utilisés dans le cadre de ma thèse.
- La deuxième équipe sur Séville, sous la direction de Pedro Nieto, est un groupe de RMN et a pris en charge la caractérisation en solution des modalités d'interactions protéine-ligand.
- L'équipe de chimiste de Milan (Italie), sous la direction d'Anna Bernardi, sont parmi les premières équipes à élaborer des sucres modifiés résistant à l'hydrolyse enzymatique. Ils ont pris en charge les travaux de « drug design » des molécules inhibitrices de DC-SIGN, des expériences de « docking » et de leur synthèse.

Notre contribution réside dans la production d'échantillon protéique pour les analyses RMN, la mise au point de test d'interaction par SPR et l'analyse des capacités d'inhibition de différentes molécules produites.

b) Organisation structurale de l'organisation tétramérique de DC-SIGN (Axe2): Cette partie de travail a été abordée sous 2 angles : premièrement par une étude SAXS impliquant une collaboration avec Dominique Durand et Patrice Vachette (Paris XI, France), deuxièmement par des essais cristallographiques sur la région responsable de la tétramérisation réalisées au sein de notre laboratoire (LPM).

c) Caractérisation des propriétés biochimiques de DC-SIGN (Axe3): Ce travail a été entièrement réalisé au laboratoire et vise à caractériser l'effet de variation du pH sur le récepteur DC-SIGN comme observé lors de l'internalisation dans le compartiment endosomal.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : Développement des outils protéiques

CHAPITRE 1: Développement des outils protéiques

Je commence par décrire ici le processus de production et de purification des protéines obtenues à partir de construction disponible lors de mon arrivée au laboratoire. Dans une deuxième partie de ce chapitre, je présenterai les constructions génétiques additionnelles que j'ai été amené à réaliser et les procédures de purification associées. Les séquences protéiques de chaque construction sont présentées dans la partie annexe (annexe.17-19).

1. Constructions disponibles DC-SIGN EC et CRD :

1.1. Surexpression et renaturation du DC-SIGN EC et DC-SIGN CRD:

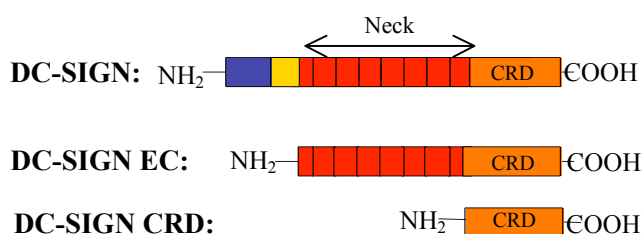


Figure.1.1: Présentation des formes tronquées de DC-SIGN:
[orange] = CRD ; [rouge] = motif répété de Neck ; [jaune] Segment transmembranaire; [bleu] Segment cytoplasmique.

La souche bactérienne BL21(DE3) est transformée avec les plasmides pET30b contenant les inserts codant pour DC-SIGN EC ou le DC-SIGN CRD (figure.1.1). Un gel SDS-PAGE (figure.1.2) présente l'évolution de la surexpression de la lectine étudiée. Une nette augmentation de l'expression de DC-SIGN EC et de DC-SIGN CRD est observable après l'induction à l'IPTG. Les 2 formes tronquées de DC-SIGN s'expriment et s'accumulent sous forme agrégée et non-structurée dans des corps d'inclusion.

Après lyse des bactéries, les protéines sont récupérées par centrifugation à 20°C et présentent alors une contamination par des débris membranaires et des protéines contaminantes associées. Des étapes de lavage de ces corps d'inclusions permettent d'éliminer de nombreux contaminants avant d'entamer l'étape de renaturation. Il s'agit donc d'une première étape de purification. Cependant, les protéines sont agrégées donc non

fonctionnelles. Il faut alors les solubiliser à l'aide d'agents dénaturants et réducteurs (guanidine et β -mercaptoéthanol), puis leur permettre de se replier convenablement.

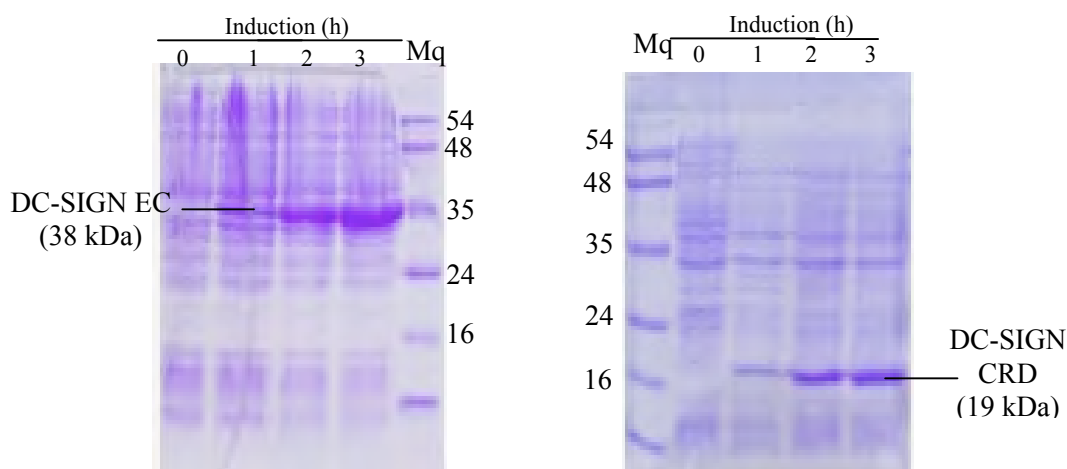


Figure.1.2: Suivi d'expression de DC-SIGN EC (à gauche) et DC-SIGN CRD (à droite) avant induction, 1h après induction, 2h après induction et 3h après induction.

Une fois les protéines cibles dépliées, la concentration en agent chaotrope est progressivement diminuée par dilution de la solution avec un tampon contenant du calcium, nécessaire à l'activité biologique de DC-SIGN et la structuration de son site actif (Lozack et *al.* 2003). Les agents qui maintenaient la protéine dépliée sont ensuite éliminés par dialyse. Puis, une ultracentrifugation permet d'éliminer les agrégats résiduels et d'obtenir une solution homogène de DC-SIGN recombinant.

Le processus de renaturation utilisé implique des dilutions importantes puis des dialyses. L'échantillon se trouve au final dilué dans un volume important et difficilement manipulable en chromatographie d'affinité. En conséquence, il faut les concentrer grâce à une cellule d'ultrafiltration. Un spectre réalisé à différents temps sert de témoin de concentration (données non présentées). Après concentration, un test Bradford a permis de quantifier la masse protéique de chaque solution obtenue (tableau 1).

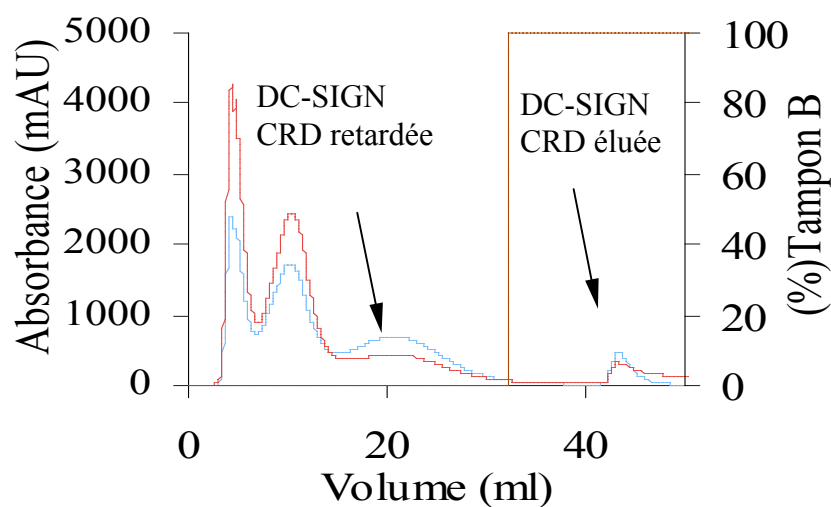
1.2. Purification des protéines:

1.2.1. Chromatographie d'affinité: Mannan-Agarose:

Les protéines DC-SIGN recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne Mannan-Agarose. Le principe repose sur le fait qu'en présence du Ca^{2+} , la tête CRD va reconnaître le mannan greffé sur la résine.

La protéine DC-SIGN CRD existe sous forme d'un monomère. Une tête CRD a pour le mannose une affinité de l'ordre du millimolaire. La faiblesse de cette interaction conduit plutôt à un retard qu'à une fixation forte sur la colonne. Ainsi, deux modes d'élutions s'imposent : une partie est retardée et éluée lors de l'étape de lavage, la deuxième partie sort en présence d'EDTA (fig.10). Les fractions éluées et retardées intéressantes sont identifiées par analyse sur gel SDS-PAGE (données non présentées). Nous avons séparé les fractions de DC-SIGN CRD éluées de celles qui sont retardées dans la suite de la purification.

A



B

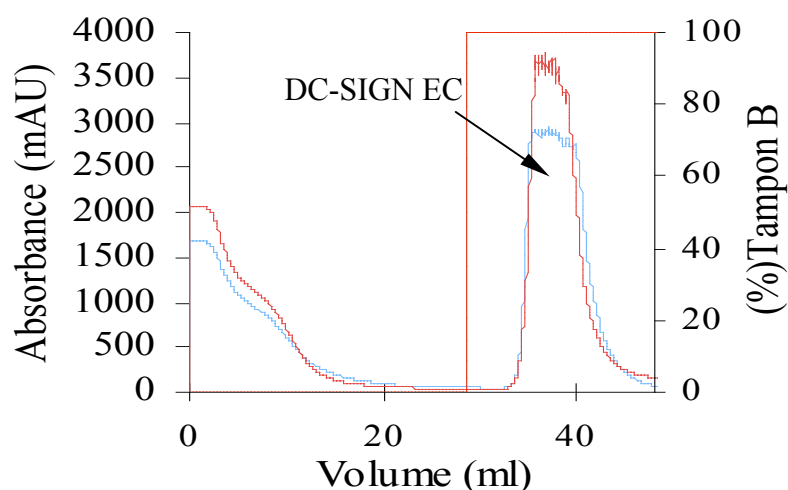


Figure.1.3: Chromatographe de la purification de DC-SIGN CRD (A)) et de DC-SIGN E (B) sur colonne Mannan-Agarose. En rouge l'absorbance à 260nm, en bleu l'absorbance à 280nm et en orange le pourcentage de tampon B.

La protéine DC-SIGN EC existe sous forme d'un tétramère et possède donc 4 têtes CRD. Cela implique une interaction de grande affinité avec la colonne liée à un phénomène d'avidité). Elle est donc exclusivement éluée par l'ajout de EDTA qui va piéger l'ion Ca^{2+} nécessaire à l'interaction protéique avec le mannan et entraîner le décrochage de la protéine.

1.2.2. Chromatographie d'exclusion:

Les différentes constructions protéiques purifiées sont déposées sur une colonne de filtration sur gel. Ainsi, au cours de la migration le long de la colonne, le tampon de la protéine est échangé et l'EDTA est remplacé par le calcium qui peut de nouveau s'installer dans le site actif de la protéine. Donc, à l'issue de cette chromatographie d'exclusion les différentes protéines obtenues sont re-métallées et donc fonctionnelles.

Une migration sur gel SDS-PAGE des différentes protéines purifiées est réalisée afin de visualiser le taux de pureté de notre échantillon (figure.1.4). La présence d'une seule bande intense par puits met en valeur l'efficacité du protocole de la purification utilisée.

Pour chaque étape de la purification, la quantité, le rendement des différentes protéines DC-SIGN obtenues sont donnés dans le tableau 1. L'analyse du bilan de la purification montre l'importance de l'étape d'affinité dans l'élimination des contaminants et des espèces mal repliées.

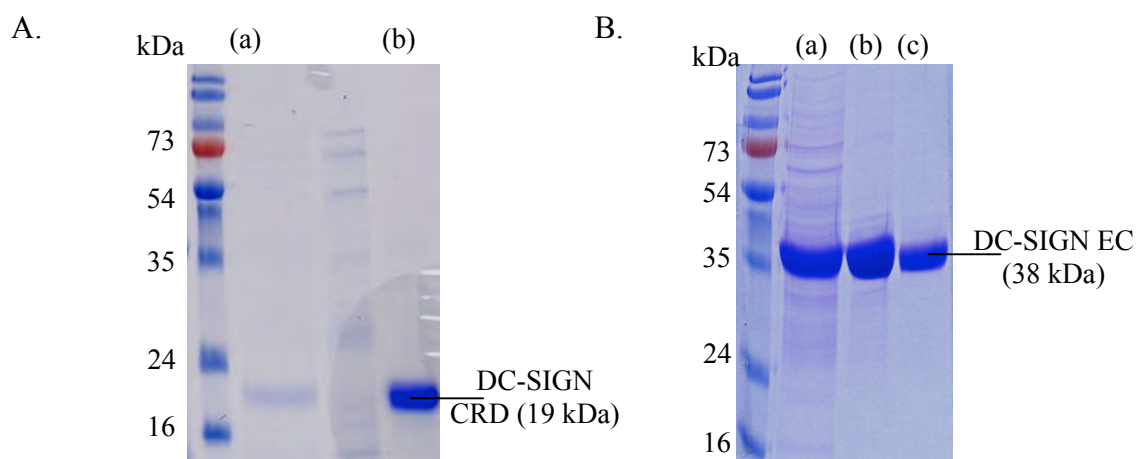


Figure.1.4: (A) Migration sur gel SDS-PAGE du DC- SIGN CRD purifiées par gel filtration: (a) correspond à la fraction retardée de DC-SIGN CRD et (b) correspond à la fraction éluée de DC-SIGN CRD ; **(B) Suivre des différentes étapes de purification de DC-SIGN EC par analyse sur gel SDS-PAGE:** (a) avant purification, (b) après Mannan-Agarose et (c) après gel filtration.

Dans le cas de DC-SIGN EC, la fixation est forte sur la colonne. Nous avons profité de celle-ci pour éliminer le maximum des contaminants. Après élution à l'EDTA, DC-SIGN EC

sort de la colonne Mannan-Agarose avec un taux de pureté très élevé (figure.1.4). Cela explique le rendement d'étape élevé, obtenu après gel filtration, puisque la solution protéique est déjà quasiment pure avant de passer sur cette dernière.

1.3. Test de fonctionnalité:

L'analyse par résonance plasmonique de surface (SPR) de la fonctionnalité des 3 solutions protéiques purifiées est réalisée sur une piste de gp120 avec un Rug de 450. Ce test permet d'évaluer le degré de fonctionnalité des préparations de DC-SIGN EC et CRD éluées de façon comparable à des préparations antérieures de référence (tableau.1).

Etapas/Protéines	DC-SIGN CRD retardée			DC-SIGN CRD éluée			DC-SIGN EC		
	Quantité (mg)	Rendement (%)		Quantité (mg)	Rendement (%)		Quantité (mg)	Rendement (%)	
		Etape	Global		Etape	Global		Etape	Global
Avant purification	52,2	100	100	52,2	100	100	614,4	100	100
Mannan-Agarose	40,05	76,6	76,6	9,54	18,3	18,3	88,9	14,5	14,5
Gel de filtration	22	55	42,2	2,4	25	4,6	80	89,9	13
Interaction avec gp120 (RU)	175 RU			500RU			1500 RU		

Tableau:1 Calcul des rendements en protéine de chaque étape : avant purification sur colonne, après purification sur colonne Mannan-agarose et après purification sur gel filtration. La quantité est la masse mesurée par Bradford en mg, le rendement d'étape ou globale est calculé en pourcentage. L'interaction avec gp120 est mesurée par BIAcore (SPR), est l'unité de résonance obtenue à l'équilibre suite à l'injection de 3.42 µg sur une piste de gp120 (RUg=760).

La différence d'affinité apparente obtenue par gp120 pour l'échantillon de CRD retardé et élué a pu être attribuée à la prédominance d'une forme dimérique artéfactuelle de CRD dans la fraction éluée du fait du pont disulfure intermoléculaire créé lors de l'étape de rénaturation (figure.1.5). En effet, lors de la construction génétique initiale, et avant la résolution de la structure CRD publiée par Mitchell et *al.* 2001, les limites du fragment DC-SIGN CRD avaient été fixés en prenant compte les acides aminés 254 à 404. Ainsi la cystéine 253 impliquée dans un pont disulfure intramoléculaire est absente dans la construction. Cela laisse la cystéine 256 libre dans la partie C-terminale du CRD, et qui peut conduire à ce pontage intermoléculaire observé lors du repliement. Une nouvelle construction rétablissant la cystéine manquante a été réalisée ultérieurement pour corriger ce problème.

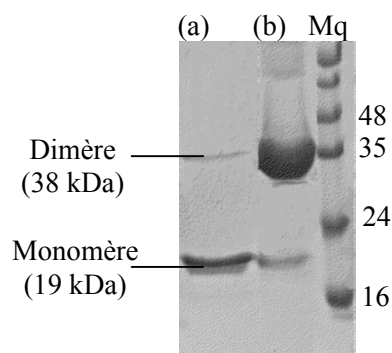


Figure.1.5: Gel SDS-PAGE du CRD élu et retardé en absence de β -mercapto-éthanol.(a) CRD retardé en absence de β -mercapto-éthanol ; (b) CRD élu en absence de β -mercapto-éthanol .

2. Nouvelles constructions génétiques réalisées:

2.1. Construction du plasmide DC-SIGN SEC:

Au cours de ce travail, et pour différents objectifs, il a fallu produire une forme de DC-SIGN EC étiqueté au Strep-tag II en N-terminal.

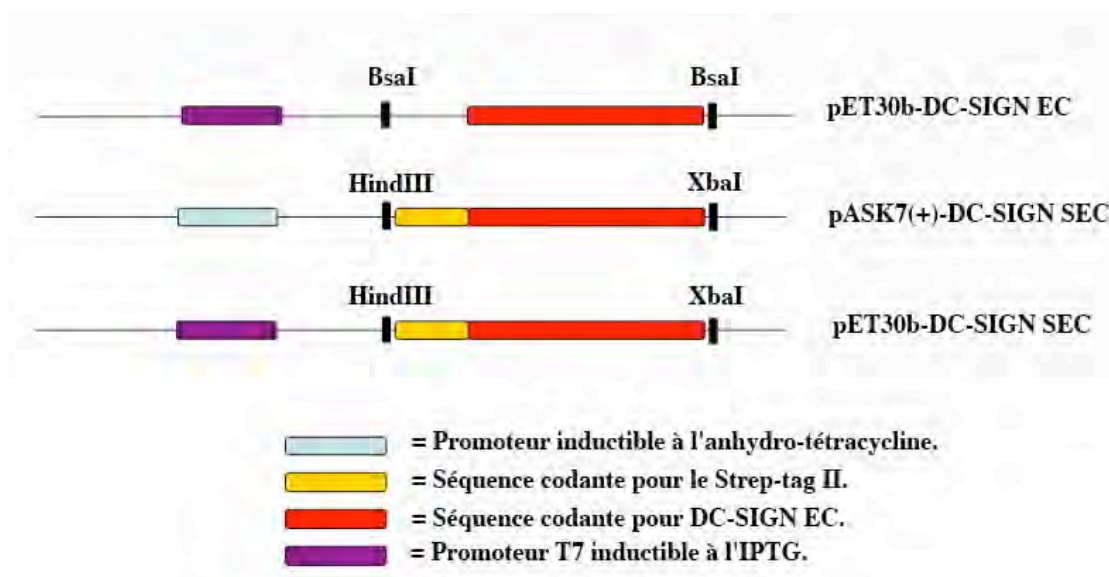


Figure.1.6: Schéma présentant les différentes constructions : initiale pET30b-DC-SIGN EC, intermédiaire pASK7(+)-DC-SIGN SEC et la construction finale pET30b-DC-SIGN SEC.

Il s'agit de la construction DC-SIGN SEC (S pour Strep-tag II et EC pour domaine extracellulaire). Cette étiquette permettra la fonctionnalisation des pistes BIAcore orientées (par la technique de capture). De plus, cette construction sera le point de départ pour la

production recombinante de la région Neck qui ne possédera plus la propriété d'interagir avec une colonne mannan-agarose et pour lequel cette étiquette sera essentielle pour la purification.

La séquence codante pour DC-SIGN SEC (insérée dans le vecteur 30b) est amplifiée par PCR et clonée en aval du Strep-tag II dans le vecteur pASK7(+). Ce vecteur s'est révélé incapable de surexprimer de manière satisfaisant la protéine.

Le fragment Strep-tag II associé au DC-SIGN EC, qu'on désigne par DC-SIGN SEC, a dû être sous-cloné de nouveau dans un vecteur pET30b par transfert d'un fragment HindIII et XbaI. L'expression dans le pET30b s'est révélée d'un niveau acceptable mais aléatoire d'une fois sur l'autre. L'insert DC-SIGN SEC a été de nouveau sous-cloné dans pET20b (figure.1.7). L'expression est ensuite devenue stable à partir de cette construction.

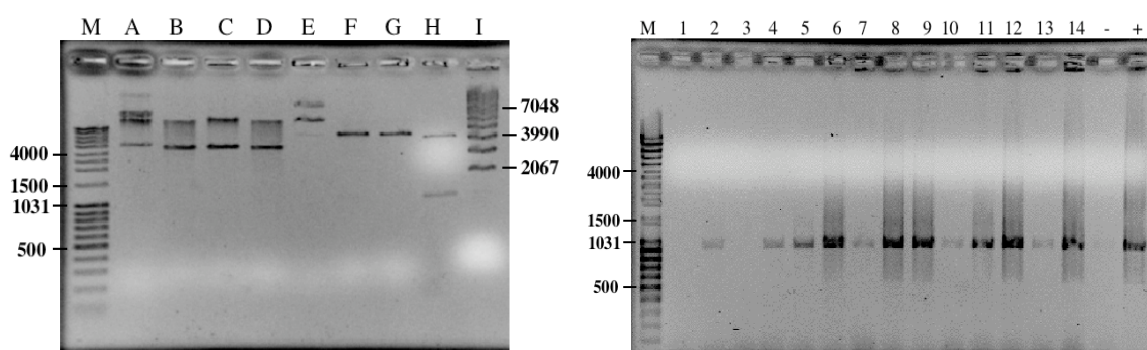


Figure.1.7: (a) gel Agarose 1% des digestions des plasmides pET30b-DC-SIGN SEC et pET20b par HindIII et XbaI. M=marqueur de taille linéaire :A=pET20b circulaire,B=pET20b digéré par HindIII, C=pET20b digéré par XbaI, D=pET20b digéré par HindIII et XbaI,E=pET30b-DC-SIGN SEC circulaire,F=pET30b-DC-SIGN SEC digéré par HindIII,G=pET30b-DC-SIGN SEC digéré par XbaI,H=pET30b-DC-SIGN SEC digéré par HindIII et XbaI,I=Marqueur de taille circulaire. **(b) gel d'agarose des PCR sur colonies de pET20b-DC-SIGN SEC.** M= Marqueur de taille linéaire, += Un contrôle positif (plasmide pEt30b-DC-SIGN SEC), -= Un contrôle négatif (à l'exception du le plasmide),1...14= Le numéro des clones sélectionnés pour le PCR sur colonies.

2.2. Expression de DC-SIGN SEC:

Des bactéries *E.coli* BL21(DE3) ont été transformées avec le plasmide pET20b-DC-SIGN SEC. Après induction à l'IPTG, une bande correspondante à la protéine DC-SIGN SEC apparaît sur gel SDS-PAGE (figure.2.1). Comme précédemment, DC-SIGN SEC est exprimée dans des corps d'inclusion. Ceux-ci subissent des étapes de lavage pour éliminer les contaminants (puits C et D de la figure 2.1) et sont resolubilisés dans la guanidine (puit E de la figure.2.1).

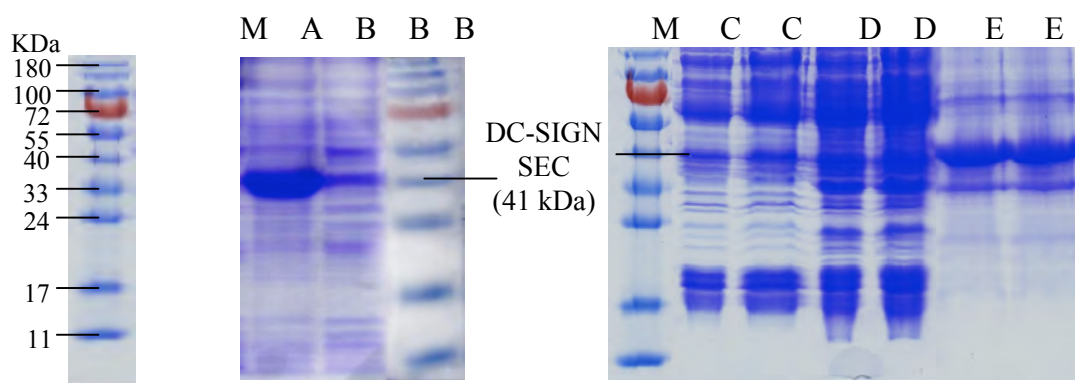


Figure.2.1: Gel SDS-PAGE pour l'expression et la purification de DC-SIGN SEC.
M :Marqueur de taille « protein prestained protein ladder »; A :BL21(DE3) transformée par pET20b-DC-SIGN SEC non induit ; B :BL21(DE3) transformée par pET20bDC-SIGN SEC après 2h d'induction ; C :Surnageant après centrifugation dans 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH= 7.8, 2 M urée, 1% Triton ; D : Surnageant après centrifugation dans 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH= 7.8, 1 % Triton; E : corps d'inclusion solubilisés dans du tampon 6M guanidine-HCl,10mM Tris-HCl pH=7.8, 0.01 β -mercapto-éthanol.

La protéine est renaturée selon le protocole déjà décrit et purifiée sur une colonne de chromatographie d'affinité Mannan-Agarose (figure.2.2). Une fois éluée sur la colonne d'affinité, la protéine est ensuite concentrée puis injectée sur une colonne Superose 6. Au final, la quantité purifiée est de l'ordre de 2mg à partir de 3L de culture.

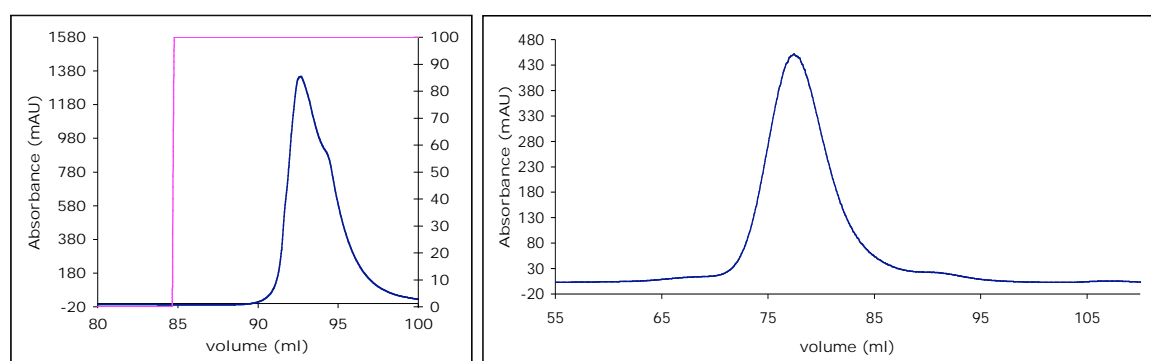


Figure.2.2: Chromatogramme de purification de DC-SIGN SEC sur colonne Mannan-Agarose (à gauche) et puis sur Superose 6 (à droite). En bleu l'absorbance à 280 nm, en rouge le changement de tampon de lavage par le tampon d'élution contenant l'EDTA.

2.3. Construction du plasmide exprimant DC-SIGN SNeck:

Cette construction est réalisée par introduction d'un codon STOP dans la construction de pET30b-DC-SIGN SEC entre la zone codante pour le Neck et la zone codante pour la région CRD de la protéine. La construction de DC-SIGN SNeck ainsi obtenue ne dispose pas d'un

taux d'expression assez important. Ainsi un changement du vecteur vers pET20b est réalisé par sous-clonage des sites XbaI et l'Hind III.

Avec les plasmides retenus comme positifs (7, 10 et 11) nous avons transformé des bactéries de type BL21(DE3). Ces bactéries sont étalées sur boîte LB+ ampicilline. À partir de ces colonies obtenues sur les boîtes nous avons réalisé une culture de 200ml où nous avons réalisé un suivi par lecture de l'absorbance à 600nm. L'induction à l'IPTG sur des cellules en phase exponentielle ($DO_{600nm} = 0,6$) a déclenché la surexpression protéique. Au cours de la culture, la surexpression est suivie sur un gel SDS-PAGE (Figure.2.3) pour des échantillons prélevés avant induction et 4h après celle-ci. En observant le gel d'expression, la bande de surexpression de la protéine DC-SIGN SNeck ($M_w = 23180$ Da) est présente chez le clone 10 et 7.

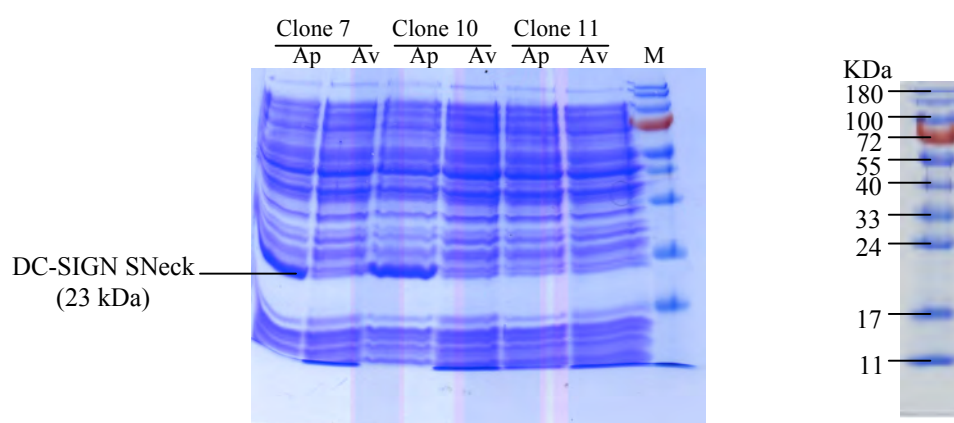


Figure.2.3: Gel d'expression de DC-SIGN SNeck par les différents clones. « Av » correspond au prélèvement réalisé avant induction et « Ap » à celui après 4h d'induction. M correspond au puit où nous avons déposé le marqueur de poids moléculaire.

2.4. Purification de DC-SIGN SNeck:

2.4.1. Surexpression de DC-SIGN SNeck:

Avec le clone de surexpression sélectionné précédemment, la surexpression de DC-SIGN SNeck est réalisée en milieu LB+ ampicilline avec induction à l'IPTG selon le même protocole que DC-SIGN EC.

2.4.2. Lyse de cellules:

Le culot cellulaire est obtenu après centrifugation de la culture. Les cellules sont lysées par sonication. Afin d'observer si la protéine DC-SIGN SNeck recombinante est exprimée sous forme soluble ou en corps d'inclusion, une centrifugation à 40 000 rpm

pendant 1h à 4°C est réalisée ainsi qu'une analyse par gel SDS-PAGE du surnageant et du culot. (figure2.4). Ainsi, la bande correspondant à DC-SIGN SNeck est présente d'une façon prédominante dans le surnageant.

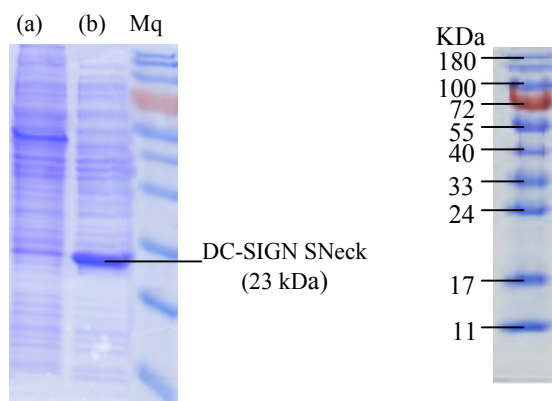


Figure.2.4: Gel SDS-Page de DC-SIGN SNeck après lyse et centrifugation. (a) correspond au culot obtenu suite à la centrifugation, (b) correspond au surnageant obtenue après centrifugation.

2.4.3. Coupure purification des protéines recombinantes sur colonnes:

La purification est réalisée à partir d'une solution protéique concentrée à 4°C à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration munie d'une membrane de polyéthersulfone de seuil de coupure 10 KDa. Un suivi de la concentration est réalisé par spectrophotométrie.

2.4.3.1. Chromatographie d'affinité:

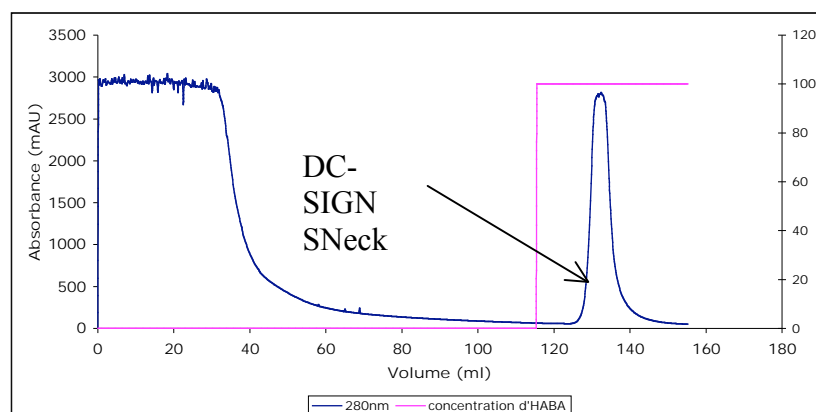


Figure.2.5: Profil de purification de DC-SIGN SNeck sur une colonne streptactine 25 ml à un débit 2,5ml/min. En bleu est représenté l'Absorbance à 280nm et en rose le pourcentage de tampon B.

Les protéines sont purifiées à température ambiante par chromatographie d'affinité sur une colonne Strep-Tactine de 25 ml en utilisant un tampon d'élution contenant de l'EDTA et

de la D- desthiobiotine (voir protocole dans Matériels et Méthodes). Un bon rendement de purification a été obtenu, de l'ordre de 40mg à partir de 2L de culture (figure.2.5).

2.4.3.2. Coupure du Strep-tag II:

Après purification sur la première colonne, la protéine est concentrée par ultrafiltration. Une partie ne sera pas digérée par le facteur Xa et sera purifiée directement sur gel filtration. Il s'agit des constructions SNeck qui seront utilisées pour les études BIAcore. L'autre partie de l'échantillon DC- SIGN SNeck sera clivée par le facteur Xa avant passage sur gel filtration. À titre d'exemple, 200µl de cette protéine à 3,89 mg/mL ont été digérées avec 4µl de facteur Xa (0,4U) à 4°C. Un prélèvement des échantillons pour gel SDS-PAGE est réalisé à 15', 30', 1h, 2h et 3h après ajout du facteur Xa (figure.2.6).

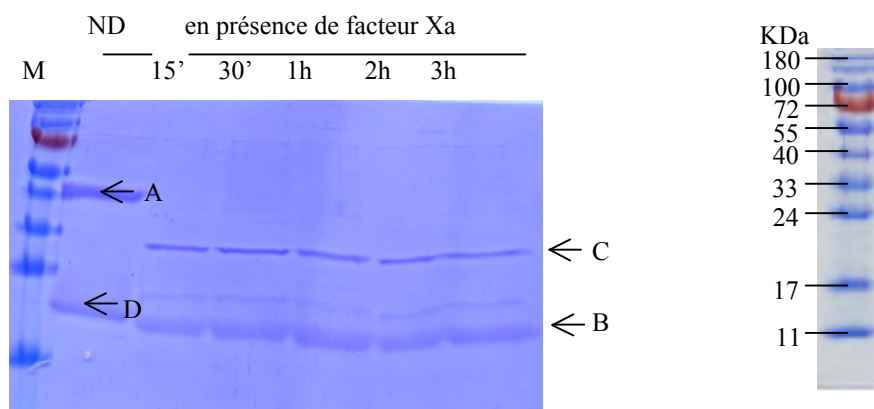


Figure.2.6: Coupure du Strep-tag II par Xa en fonction du temps. M correspond au marqueur de poids moléculaire, ND à la protéine DC-SIGN SNeck juste après l'ajout du facteur Xa, la bande A correspond au dimère de DC-SIGN SNeck avec son Strep-tag II, la bande B au monomère de DC-SIGN Neck sans Strep-tag II, la bande C correspond au facteur Xa. et D=monomère de DC-SIGN SNeck avec Strep-tag II.

Les résultats montrent qu'à partir de la 15^{ème} minute, tout le lot de DC-SIGN SNeck est digéré par Xa. Il existe 2 bandes A et D sur le gel correspondant respectivement au DC-SIGN SNeck dimérique non digéré et monomérique digéré (vérifié par un séquençage N terminal). La protéine obtenue est appelée maintenant DC-SIGN Neck (Mw = 21 399 Da).

2.4.3.3. Chromatographie d'exclusion:

Les deux échantillons DC-SIGN SNeck et Neck sont purifiés sur une colonne Superdex 200 de 110 ml (voir Matériels et Méthodes). Les profils de cette étape de purification sont présentés dans la figure.2.7. En effet, la protéine DC-SIGN Neck servira

dans les études biochimiques (chapitre 3 de la partie Résultats) alors que la DC-SIGN SNeck servira dans les études SPR par technologie BIAcore (Chapitre 4 de la partie Résultats).

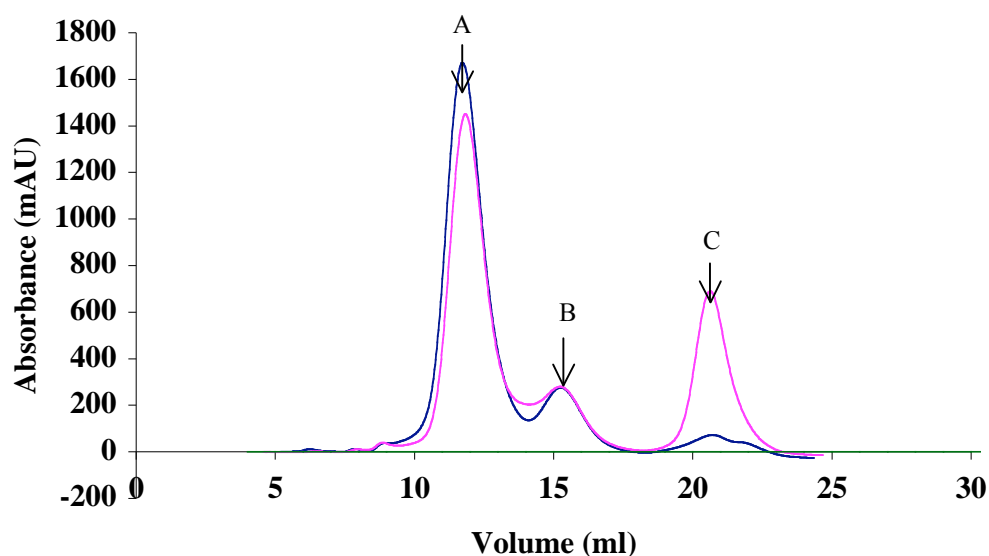


Figure.2.7: Profil de purification de DC-SIGN SNeck sur une colonne superdex 200 (110 ml). En rose est représentée l'absorbance à 280nm de DC-SIGN Neck après 15 minutes de digestion par le facteur Xa. En bleu est représentée l'absorbance à 280 nm de DC-SIGN SNeck. A et B correspondent à DC-SIGN Neck et C au facteur Xa pour la courbe en violet et à l'EDTA pour la courbe en bleu.

Nous observons sur gel filtration, les pics A et B qui correspondent sur gel SDS-PAGE à DC-SIGN SNeck ou Neck (figure.2.8) et C à l'enzyme Xa (observé sur gel SDS-PAGE, données non présentées).

Les fractions correspondant aux pics A et B élués sur colonne superdex 200, qui sont observés chez les deux protéines DC-SIGN Neck/SNeck, ont fait l'objet d'un séquençage N-terminals et d'une analyse par spectrométrie de masse (voir annexe paragraphe 20 et 21 pour la construction DC-SIGN Neck). Les résultats de ces deux techniques, ainsi que le gel SDS-PAGE présenté dans la figure.2.8.A, ont démontré que les pics A et B correspondent bien à la même protéine DC-SIGN Neck. Le gel SDS-PAGE présenté dans la figure.2.8.B démontre l'efficacité de cette étape de purification dans l'élimination du facteur Xa pour la construction DC-SIGN Neck ayant au préalable été digérée par cette enzyme.

Le fait que DC-SIGN Neck/SNeck sorte en 2 pics permet de suggérer qu'il existe deux formes d'oligomérisation de la protéine. Ceci fait l'objet d'une étude détaillée dans le chapitre 3 de la partie Résultats.

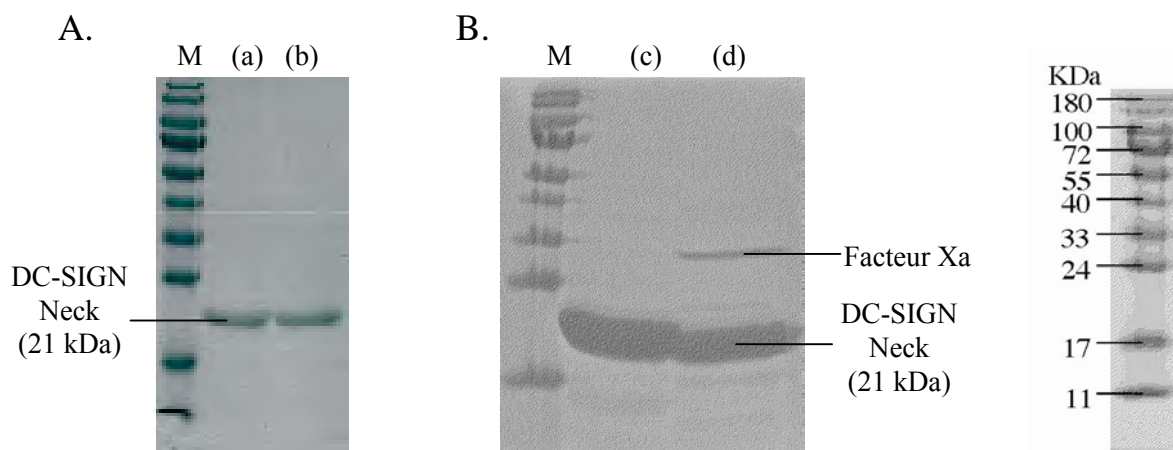


Figure.2.8: A- Correspond au gel SDS-PAGE pour les 2 pics observés sur le profil de purification de DC-SIGN Neck sur gel filtration. B-Correspond au gel SDS-PAGE pour le pool de DC-SIGN Neck avant et après purification sur gel filtration. (a) correspond au pic A de DC-SIGN Neck, (b) correspond au pic B de DC-SIGN Neck, (c) correspond à l'échantillon de DC-SIGN Neck digéré par le facteur Xa (regroupant les deux pics A et B) après son passage sur gel filtration, et (d) correspond au pool de DC-SIGN Neck en présence de facteur Xa avant l'étape de purification sur gel filtration.

Le Rendement des différentes étapes de purification de la construction DC-SIGN Neck ont été reporté dans le tableau 2.

Étapes	DC-SIGN SNeck		
	Quantité (mg)	Rendement (%)	
		Etape	Global
Avant purification	102	100	100
Strep-Tactine	62,5	61,3	61,3
Supedex	45	72	44,2

Tableau2 : Calcul des rendements en protéine de chaque étape : avant purification sur colonne, après purification sur colonne Strep-Tactine et après purification sur gel filtration (Superdex). La quantité est la masse mesurée par Bradford en mg, le rendement d'étape ou globale est calculé en pourcentage. Ces rendements sont calculés pour des culots obtenus par centrifugation de 2 L de culture bactérienne.

RESULTATS

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules ligands
potentiels pour DC-SIGN

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules ligands potentiels pour DC-SIGN

1. Introduction:

DC-SIGN est une lectine découverte dans l'année 2000 par le groupe de Geijtenbeek comme étant un récepteur membranaire spécifique du VIH (Geijtenbeek et *al.* 2000a). Depuis, plusieurs études ont démontré que DC-SIGN est capable d'interagir avec des nombreux pathogènes viraux, bactériens, levures et parasites (Zhou et *al.* 2006). L'organisation des domaines de DC-SIGN et leurs rôles respectives sont présentés dans la figure.1.

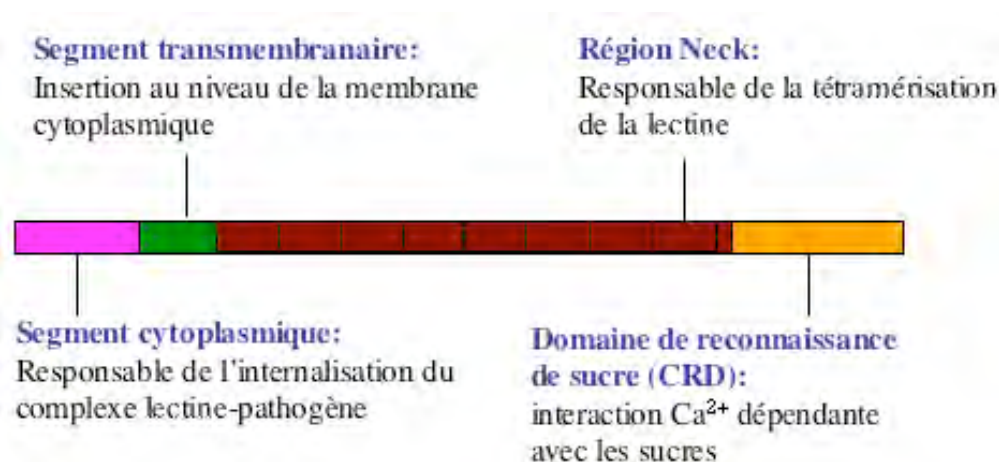


Figure.1 : Présentation des domaines de DC-SIGN et leurs fonctions

DC-SIGN est capable de reconnaître des séquences hautement mannosylés présentes à la surface des glycoprotéines des enveloppes virales du VIH, le gp120. Le fait que DC-SIGN soit impliquée dans les premières étapes de l'infection par le VIH et au-delà dans de nombreuses pathologies font de cette lectine une cible thérapeutique potentielle d'intérêt majeur. Des études hydrodynamiques ont démontré que la protéine DC-SIGN est organisée en homotétramère et présente ainsi 4 têtes CRDs (figure.2).

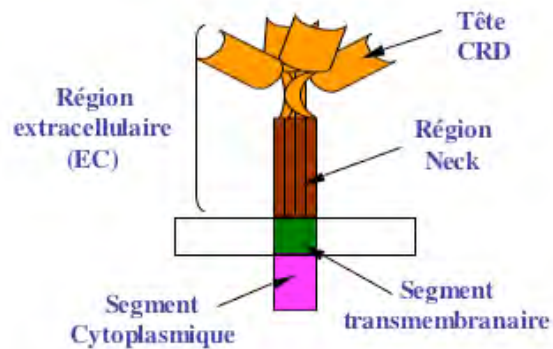


Figure.2: Schéma de l'organisation tridimensionnelle de DC-SIGN.

De plus, DC-SIGN est présente à la surface de cellules dendritiques au sein de rafts lipidiques sous forme de microdomaines. Un plateau d'interaction de haute affinité aux virus est ainsi réalisé avec plusieurs niveaux de multivalence :

- Le caractère oligomérique du récepteur DC-SIGN.
- La multiplicité des récepteurs concentrés au niveau des microdomaines.
- La multiplicité des sites de glycosylations présents sur les protéines de l'enveloppe virale.
- Le nombre de protéines d'enveloppe à la surface du virus (figure.3)

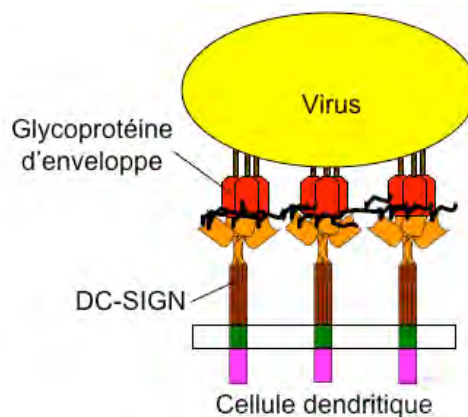


Figure.3: Schéma de l'interaction multivalente entre les patches de DC-SIGN EC et les glycoprotéines de surfaces des pathogènes.

Les microdomaines de DC-SIGN agissent ainsi comme des plateaux d'attachement et/ou d'entrée pour les pathogènes. Pour entrer en compétition avec des telles interactions multivalentes, il faut également produire des ligands multivalents. De telles molécules peuvent représenter un intérêt dans l'inhibition de la reconnaissance de pathogènes, la

production d'outils biotechnologiques pour des outils de diagnostic de marquage, de suivi de trajet intracellulaire, ou approche vaccinale dirigée vers les cellules dendritiques myéloïdes ...

Dans cet objectif, une présentation multivalente des ligands oligosaccharides par une molécule cœur imitant le modèle naturel d'organisation des structures glycosylés doit être réalisé. En prenant cela en considération, et dans le cadre d'une collaboration réalisée avec des chimistes, des molécules multivalentes basées sur le squelette Boltorn (un polymère hyperbranché) ont été envisagées. Des dérivés de seconde et troisième générations de Boltorn (BH20 et BH30) ont été fonctionnalisés par des unités mannoses. De telles structures sont des composés hautement solubles et ne présentent aucune cytotoxicité sur des nombreuses lignées cellulaires, comme testé antérieurement (Arcé et *al.* 2003).

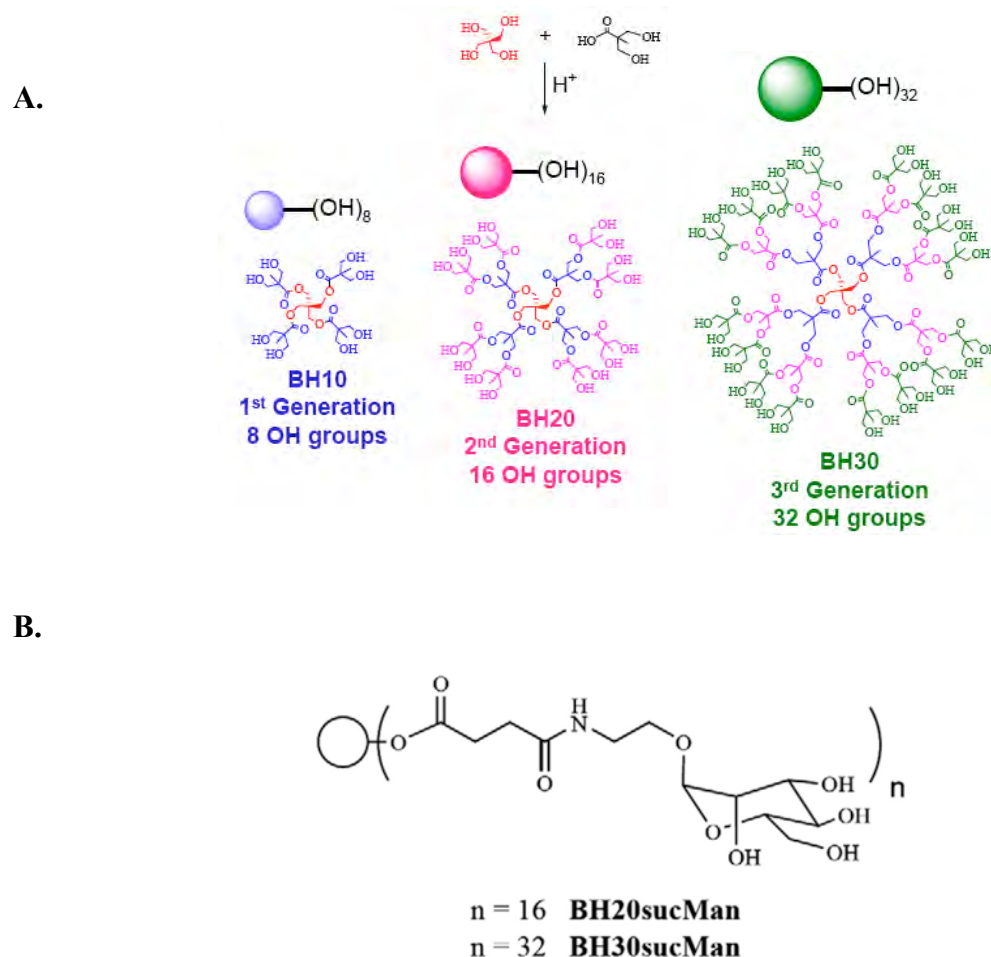


Figure.4 : (A) Structure des 3 générations de Boltorn : BH10, BH20 et BH30,(B) espaceur d'acide succinique avec une unité mannose. Quand il y a 32 espaceurs avec leurs mannoses sur le Boltorn, la molécule s'appelle BH30sucMan (suc pour acide succinique et Man pour mannose), et quand la molécule Boltorn porte 16 espaceurs fonctionnalisés avec une unité mannose chacun, la molécule s'appelle BH20sucMan.

Les Boltorns sont des molécules synthétisées à partir de deux molécules : un cœur tétrahydroxylique et l'acide 2,2-diméthylpropionique par phénomène d'estérification en milieu acide. La première génération de Boltorn dite BH10 correspond à une molécule cœur qui a subi une première couronne d'estérification, la deuxième génération est celle de la première génération qui a acquis une deuxième couronne d'estérification. La troisième génération est une molécule de deuxième génération qui a obtenu une troisième couronne par estérification. Ces couronnes au fur et à mesure de leur addition vont permettre d'augmenter le niveau de branchement et cela va donc permettre de greffer de plus en plus des espaceurs d'acide succinique sur leur groupe hydroxyle. Sur ces derniers vont être greffés les sucres synthétisés par nos collaborateurs. La présence de multiples unités sucrées sur les branchements de la molécule permet une augmentation locale de la concentration en sucres. Celle-ci couplée au phénomène de multivalence et d'avidité permet l'interaction avec les récepteurs.

La présence de liaisons esters au sein de cette molécule lui confère des propriétés particulières : une résistance thermique et chimique importante, le niveau de branchement élevé leur permet une meilleure réactivité et une faible viscosité.

L'avantage majeur d'avoir les sucres fixés sur la molécule, du point de vue physicochimique, est d'induire une très faible viscosité par rapport à celle qui serait obtenue par un même effet de concentration locale avec des sucres à l'état libre.

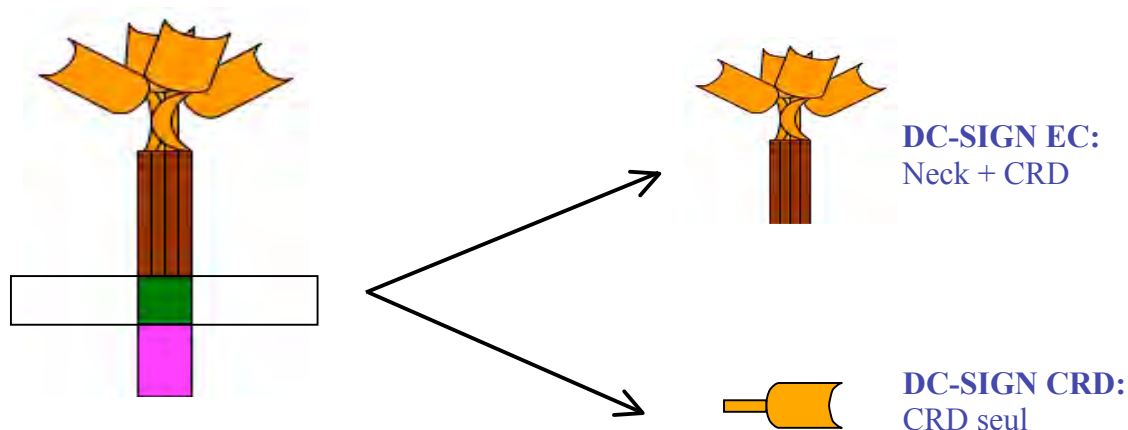


Figure.5: Schéma des différentes constructions protéiques réalisées pour les études des molécules.

Afin de réaliser les études d'interaction et de compétition entre DC-SIGN et les molécules à tester, il a fallu au départ élaborer les outils protéiques nécessaires pour ces études. Comme il est dur de purifier la protéine membranaire, des formes tronquées ne présentant pas la partie transmembranaire ont été utilisés. Il s'agit du DC-SIGN EC (EC pour extracellulaire) qui se présente en organisation tétramérique puisqu'elle garde la région Neck responsable de son oligomérisation. Comme l'aspect multivalente intra- et intermoléculaire nous intéresse dans nos études, nous avons également produit la construction ne présentant pas le phénomène multivalent d'interaction. Il s'agit de la construction protéique DC-SIGN CRD qui dispose uniquement le domaine de reconnaissance de sucre. Ces deux constructions sont capables d'interagir d'une façon calcium-dépendante avec les composés sucrés, DC-SIGN EC étant la seule disposante des propriétés d'avidité en solution.

2. Organisation du travail et objectif:

2.1. Validation du concept d'interaction et d'inhibition par présentation multivalente d'un ligand:

Ceci correspond au travail publié dans le premier article: Tabarani G, Reina JJ, Ebel C, Vivès C, Lortat-Jacob H, Rojo J, Fieschi F. Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. FEBS Lett. 2006;580(10):2402-8.

Dans un premier temps, il a fallu vérifier si le squelette Boltorn permet une présentation efficace de ligand pour promouvoir des interactions multivalentes avec DC-SIGN et plus précisément avec un modèle de DC-SIGN organisé en microdomaine. Ainsi, l'étude a démarré avec un premier composé fonctionnalisé avec le plus simple des ligands reconnus par le CRD de DC-SIGN, le mannose. Afin de valider le concept, les molécules Boltorn sont synthétisées comme des polymères présentant une pureté de l'ordre de 76%.

Pour cette première étape d'étude, l'objectif était d'observer l'interaction. Ainsi les outils protéiques à notre disposition, des constructions protéiques sans étiquette, nous ont permis de réaliser la première étude directe d'interaction et d'inhibition. En effet, des pistes non orientées protéiques sont réalisées à différentes densités par un pontage chimique entre les pistes et les différentes protéines. Ainsi, pour cette étude nous avons réalisé deux types de pistes non orientées (figure.6):

- La piste sur laquelle nous avons immobilisé la protéine d'une façon non orientée. En fait, DC-SIGN ECD et CRD disposent de plusieurs groupes lysines exposés à la surface de la protéine capables d'interagir grâce à leur groupe amine avec les groupes acides COOH présents à la surface des pistes dextran. En effet, l'analyse de la séquence de la région Neck de DC-SIGN indique la présence de 14 résidus Lysine et celui de CRD 6 autres lysine. Ainsi, le contact réalisé par DC-SIGN avec la piste ne se fait pas d'une façon homogène tout le long de la piste puisque différents points de fixation impliquent différentes orientations.

- La piste fonctionnalisée par des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH, la gp120. Cette fonctionnalisation est obtenue grâce à l'interaction de l'amine des lysines présentes et qui sont nombreuses au sein de la partie protéique de la gp120. Ainsi, on pourrait conclure que la piste fonctionnalisée par la gp120 n'est pas orientée.

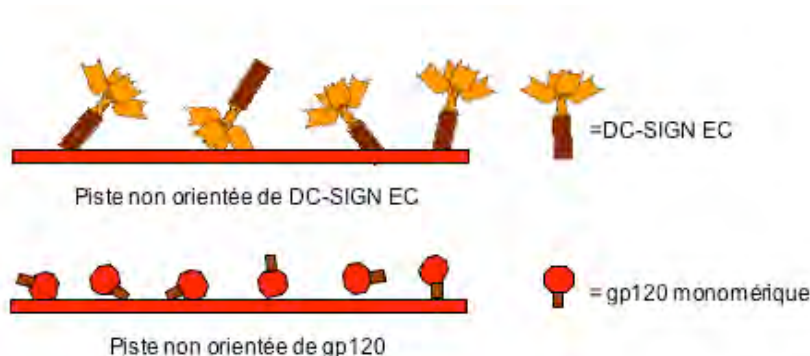


Figure.6: Les pistes non orientées protéiques et glycoprotéiques

Les résultats obtenus valident l'interaction directe de DC-SIGN et puis la capacité des molécules synthétisées à inhiber l'interaction de DC-SIGN avec la gp120.

Les conclusions tirées de ce travail sont :

- Ce type de molécules Boltorn présentant du mannose est capable d'interagir avec des surfaces DC-SIGN. Cette interaction est dépendante de la densité de CRD présentée à la surface.

- La dépendance de l'interaction vis-à-vis de la densité permet de suggérer l'hypothèse d'une interaction multivalente intermoléculaire entre le CRD présent au niveau de ces surfaces. Cet aspect est confirmé en solution : une molécule de Boltorn fonctionnalisée avec du mannose est capable de ponter plusieurs récepteurs DC-SIGN EC libres en solution.

- La validation de la capacité inhibitrice du Boltorn fonctionnalisé à inhiber l'interaction de DC-SIGN avec la gp120. Cette inhibition est dépendante du niveau de branchement du Boltorn. En effet, plus le niveau de branchement du Boltorn est important, plus l'inhibition de cette interaction est importante.

- Dans le contexte expérimental utilisé, le Boltorn le plus branché présente une affinité de l'ordre du μM avec des surfaces de DC-SIGN EC. L'affinité du DCSIGN CRD pour cette molécule est de l'ordre de mM (voir « supplementary materiel »).

Détails des contributions au travail réalisé:

Le travail présenté dans l'article à suivre a été entièrement conduit à l'IBS. Les glycodendrimères BH20 et BH30mannosylés ou non ont été produits et fournis par l'équipe de Javier Rojo de CSIC de Séville.

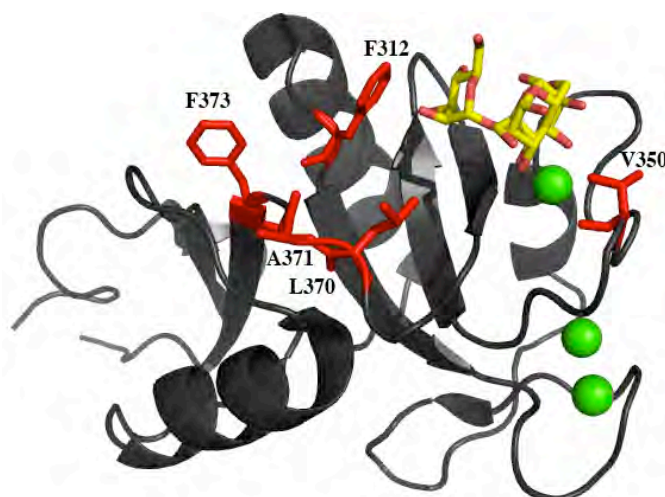
Après avoir validé le concept de multivalence il a fallu passer à un cran supérieur de l'étude où nous nous sommes intéressés à l'amélioration du ligand avec lequel le Boltorn sera fonctionnalisé mais également à la mise au point d'une piste orientée de DC-SIGN permettant ainsi de s'approcher du modèle d'organisation au niveau cellulaire.

2.2. Optimisation de la fonctionnalisation et de la nature du ligand osidique :

2.2.1. Modification de l'emplacement du branchement sur le cycle osidique :

La molécule BH30sucMan a été validée comme structure de présentation de sucres capable d'interagir d'une façon multivalente avec DC-SIGN. La fonctionnalisation des mannoses pour créer le BH30sucMan a été réalisée sur le carbone en position anomérique

A.



B.

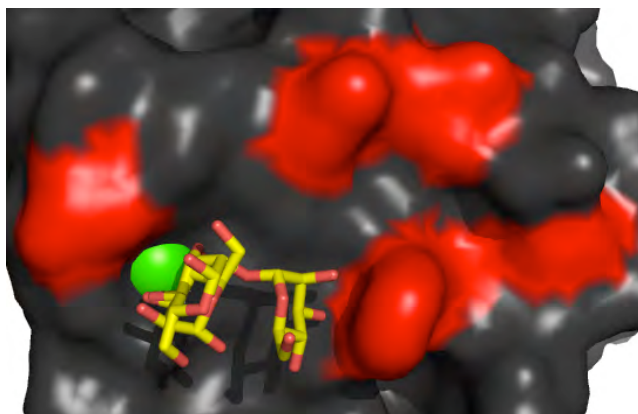


Figure.7: (A) Résolution de la structure de DC-SIGN CRD en présence d'un dimannose (PDB 2IT6, Feinberg et *al.* 2007): On note en vert le calcium, en jaune le dimannose et en rouge les acides aminés de la poche hydrophobe située à la surface du CRD :V350, L370, A371, F373, F312. **(B) Vue de surface du CRD interagissant avec le Dimannose:** on note en rouge la poche hydrophobe, en vert l'ion calcium et en jaune le dimannose.

Cela a été réalisé pour deux raisons : premièrement, les carbones impliqués dans l'interaction avec DC-SIGN sont les carbones 2, 3 et 4. Deuxièmement, la position la plus facile à fonctionnaliser pour la synthèse de polymères polyosidiques est la position anomérique.

La résolution de la structure du domaine de reconnaissance de sucre (CRD) a permis de mettre en évidence des résidus hydrophobes à la surface de ce domaine. Ainsi, l'introduction d'un groupement hydrophobe au niveau de la position anomérique, comme un cycle aromatique, pourrait améliorer l'affinité de l'interaction du mannose avec les acides aminés hydrophobes présents au niveau de la poche hydrophobe du CRD (figure.7.B). A titre d'exemple, je cite le travail du groupe de Stassinopoulou qui a utilisé le 4'-nitrophenyl R-Dmannopyranoside pour inhiber une lectine appelée concanavalin A (Hamodrakas et *al.* 1998).

Ainsi pour fonctionnaliser cette position 1, il faut pouvoir relier le sucre au polymère hyperbranché sur une autre position. La position 6 est l'unique possibilité envisageable.

L'effort de synthèse pour produire des glycodendrimères, avec une fonctionnalisation du sucre à l'espaceur par sa position 6, est trop important par rapport à la question posée. Il a été décidé de tester l'effet de la fonctionnalisation espaceur-Mannose en position 1 ou 6, au niveau d'une unité monosaccharidique. Ceci entraîne par contre un problème potentiel pour la mesure d'interaction DC-SIGN-ligand en SPR du fait des affinités de l'ordre du millimolaire pour les ligands monosaccharidiques.

Pour contourner cette difficulté et simuler une présentation multivalente, nos collaborateurs ont produit un espaceur permettant la fonctionnalisation directe de pistes BIAcore sur la base de la chimie de couplage utilisée pour les protéines (couplage EDC+NHS décrit dans la partie Matériels et Méthodes) (voir figure.8).

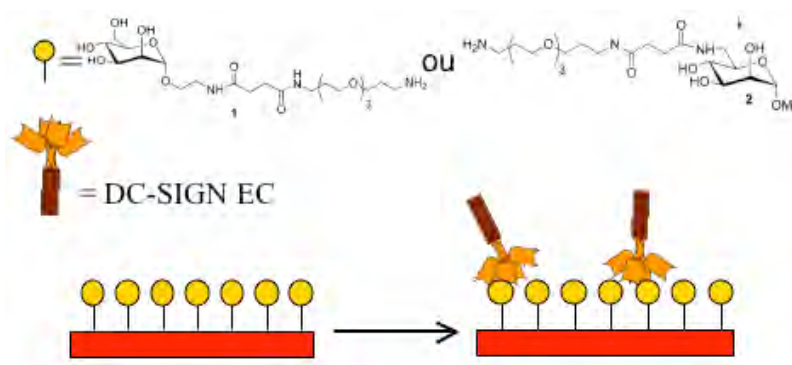


Figure.8: Présentation schématique des pistes glycosidiques orientées : avec les molécules sucrées en jaune sur les surfaces de la puce BIAcore en rouge.

Une extrémité de cet espaceur présente donc le mannose, l'autre mime la chaîne latérale d'un résidu lysine permettant la fonctionnalisation sur les pistes. Une fonctionnalisation à un niveau de densité suffisante permet de reproduire la multivalence avec cette fois DC-SIGN en

phase soluble. Avec ce type de dispositif, nous avons notre première piste fonctionnalisée avec des sucres d'une façon orientée. La production de ces ligands, la fonctionnalisation de ces pistes et donc l'influence du site de liaison du sucre à l'espaceur a été évaluée dans l'article (Reina, J, Maldonado, OS, Tabarani, G, Fieschi, F, and Rojo J. Mannose glycoconjugates functionalized at positions 1 and 6. Binding analysis to DC-SIGN using Biosensors. Bioconjugate Chemistry 2007; 18, 963-9).

Ce travail a démontré que:

- L'espaceur développé est un bon outil pour générer des pistes de sucres orientées.
- La fonctionnalisation par le C1 ou le C6 ne semble pas induire de différences de reconnaissance.

Détails des contributions au travail réalisé:

La partie synthèse a été effectuée par le groupe de Javier Rojo . La partie biochimique, préparation de la protéine et analyse BIAcore, a été réalisée à l'IBS-Grenoble.

Ce travail ouvre des perspectives de production des systèmes multivalents présentant des ligands optimisés par l'ajout de groupements au niveau du carbone C1. Notre réseau (Séville, Milan, Grenoble) s'est donc ensuite engagé dans la définition de meilleurs ligands que le mannose.

2.2.2. Caractérisation de nouveaux ligands type glycomimics:

2.2.2.1. Le pseudo- mannose(α 1-2)mannose: le 1,2-mannobioside

2.2.2.1.1. Etudes avec le 1,2-Mannobioside monovalent:

DC-SIGN est une lectine qui reconnaît les unités hautement mannosylés et plus particulièrement le mannose(α 1-2)mannose présent à l'extrémité des séquences « high mannose ». Ces 2 unités mannoses interagissent avec une affinité proche de celle de la séquence « high mannose » composée de 9 unités osidiques (Adams et *al.* 2004).

En se basant sur ces données, nos collaborateurs ont voulu ainsi passé à une étape de synthèse de ligands possédant 2 unités osidiques tout en prenant en compte l'importance d'avoir une molécule avec une grande stabilité conformationnelle, chimique et également une résistance face aux glycosidases. Comme le mannose(α 1-2)mannose ne possède pas ces trois critères fixés par la collaboration, des modélisations par « Drug design » d'une molécule dérivé de type glycomimics mimant ce disaccharide ont été réalisés. Cette molécule disaccharidique dérivée, le mimic 1,2-Mannobioside, a été élaborée puis synthétisée au sein du groupe d'Anna Bernardi de l'université de Milan (figure.9).

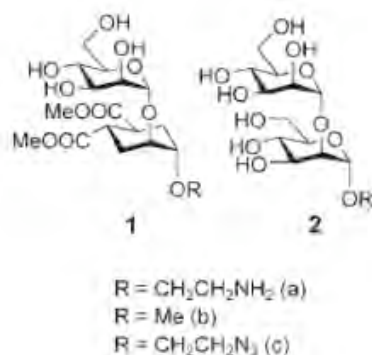


Figure.9: Les structures du Man(α 1-2)Man (en 2) et de son dérivé « mimic » (en 1).

Ce modèle synthétique se base sur un pseudo-mannose qui contrairement au mannose possède un carbone à la place de l'oxygène au sein de son cycle. Ainsi le cycle pyranique est remplacé par un cyclohexane. Cette molécule dérivée dispose d'une géométrie structurale et conformationnelle identique à celle de son modèle naturel, le mannose(α 1-2)mannose. Cependant le 1,2-Mannobioside dispose d'une meilleure stabilité face à l'hydrolyse enzymatique comme le montre des essais préalable sur la Jack-bean mannosidase (Mari et *al.* 2004).

La synthèse, l'interaction avec DC-SIGN par Saturation Transfert Difference (STD), le Docking dans le site de reconnaissance ainsi qu'une étude *in vivo* des capacités antivirales dans un modèle d'infection cellulaire aux virus de l'Ebola ont été réalisés et publiés dans l'article suivant : Reina JJ, Sattin S, Invernizzi D, Mari S, Martínez-Prats L, Tabarani G, Fieschi F, Delgado R, Nieto PM, Rojo J, Bernardi A. 1,2-Mannobioside Mimic: Synthesis, DC-SIGN Interaction by NMR and Docking, and Antiviral Activity. *ChemMedChem*. 2007;2(7):1030-1036. Pour des raisons de clareté, cet article est présenté dans la partie Annexe.

Les analyses ainsi présentées dans cet article et conduite par le groupe de Pedro Nieto et d'Anna Bernardi peuvent être décrites ainsi :

a) La technique RMN-STD (Saturation transfer Difference) permet de caractériser l'interaction d'un ligand (L) avec une protéine (P). En irradiant la protéine, il y a transfert de saturation de la protéine vers le ligand impliqué dans l'interaction. Donc, au fur et à mesure du temps de saturation, l'échange P+L en PL va augmenter le nombre de ligands saturés; ceci va permettre d'obtenir un spectre RMN particulier à la fréquence de résonance de la protéine (on-résonance). Le pourcentage de saturation des noyaux du ligand varie selon son affinité pour la protéine. Concrètement, cette méthode a été développée par Meyer & Mayer (1999), sur l'agglutinine, et permet de comparer les spectres suivants:

Si on souhaite prouver qu'un ligand L dans un lot de ligands potentiels peut interagir avec une protéine P, on doit réaliser trois spectres:

A: spectre RMN de la protéine P pour filtrage.

B: spectre RMN du ligand L suspecté.

C: spectre RMN-STD protéine P + ensemble de ligands.

Le spectre (C-A) comparé au spectre B de ligand Libre L permet de valider l'existence d'une interaction.

b) La technique RMN TR-NOESY (Exchange-transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy) fournit des informations à propos de la distance internucléaire dans un ligand à l'état fixé. Les analyses des amplitudes des signaux sont basées sur l'hypothèse d'un échange rapide entre l'état libre et fixe du ligand. Un spectre est réalisé au départ pour le ligand à l'état libre puis un autre est réalisé pour la protéine en présence de son ligand. Par une comparaison

entre ces deux spectres, il est possible d'évaluer la conformation préférentielle adoptée par le ligand dans le site de reconnaissance de la protéine.

Les données publiées dans l'article de Reina et *al.* 2007 ChemBioChem montrent que:

- Le mimic 1,2-Mannobioside interagit bien avec DC-SIGN en solution comme l'atteste les expériences réalisées par RMN.

- Le mimic 1,2-Mannobioside possède de 2 conformations à l'état libre comme son modèle naturel.

- L'interaction réalisée entre le mimic et DC-SIGN ne privilégie pas spécialement une conformation par rapport à une autre.

- Le mimic disposerait d'une capacité inhibitrice plus importante que son modèle naturel, mannose(α 1-2)mannose, comme le suggère un test d'inhibition dans un modèle cellulaire d'infection au virus Ebola.

Ainsi, ce travail a permis de valider le concept d'utilisation d'une molécule chimique pseudo-sucrée disposant d'une meilleure affinité et d'une bonne stabilité face aux glycosidases.

Ce ligand a ensuite été utilisé pour générer des dendrimères Boltorn de 3^{ème} génération pour obtenir le BH30Suc1,2mimic correspondant. Lors du couplage du ligand sur le dendrimère, une fonctionnalisation partielle a été obtenue (26 unités 1,2-Mannobioside au lieu de 32). Ainsi, la molécule est appelée BH30(Suc1,2Mimic)₂₆. Nous avons ensuite testé ce nouveau glycodendrimère par étude d'inhibition de l'interaction DC-SIGN/gp120 par technologie SPR (BIAcore). Les résultats préliminaires obtenus sur ce glycodendrimère « mimic » n'ont pas été inclus dans l'article (du fait de la fonctionnalisation partielle) mais sont reportés ci dessous.

Détails des contributions au travail réalisé:

La synthèse du mimic 1,2-Mannobioside a été effectuée conjointement par les laboratoires d'Anna Bernardi (Milan) et de Javier Rojo (Séville). Les analyses RMN ont été menées conjointement par le groupe d'Anna Bernardi et le groupe de Pedro Nieto (Séville). Les protéines nécessaires en solution deutérées pour les expériences en STD et TR-NOESY ont été préparées par nos soins. Finalement, les tests d'inhibition cellulaires ont été effectués par le groupe de Rafael Delgado (Madrid). Les analyses par technologie SPR (BIAcore) additionnel avec la version multivalente BH30Suc1,2mimic non-inclus dans l'article ont été réalisés par nos soins.

2.2.2.1.2. Etudes avec le 1,2-Mannobioside multivalent:

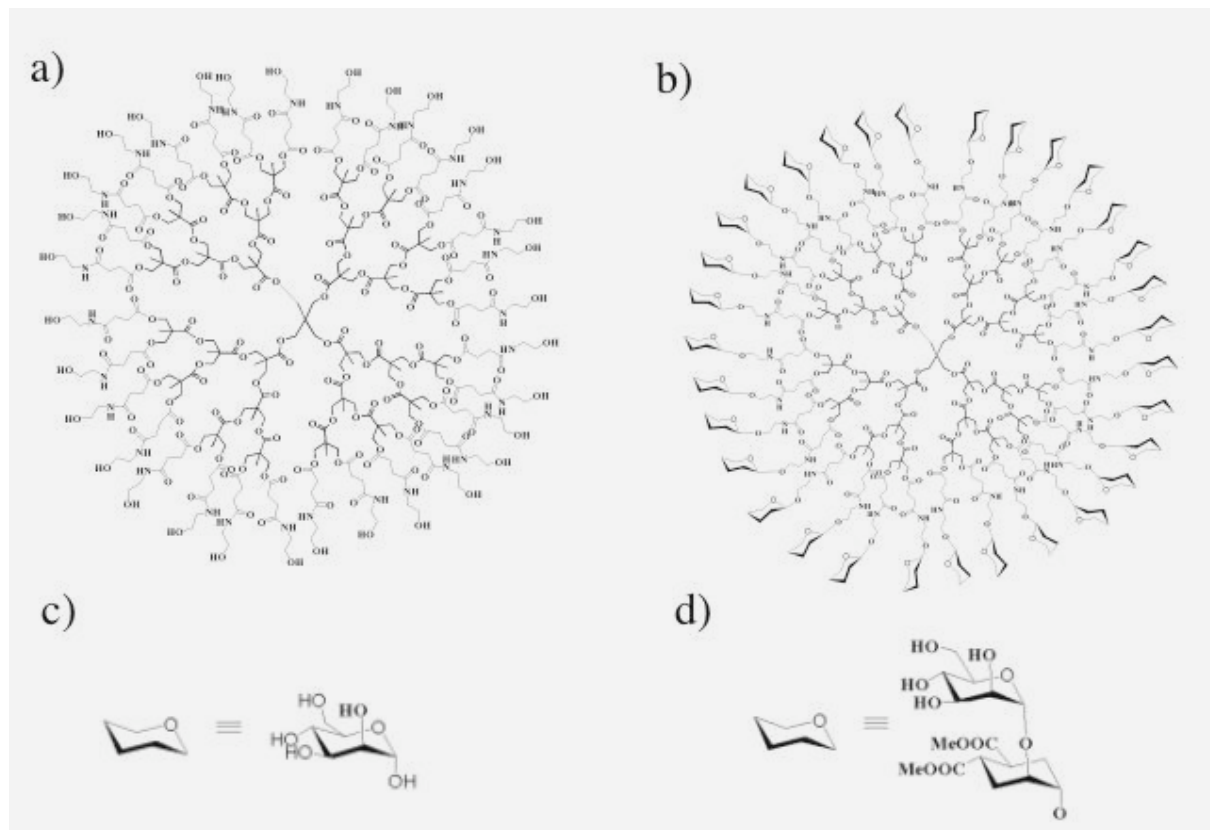


Figure.10 : Les molécules BH30Suc1,2mimic et son témoin le BH30SucL' (partiellement fonctionnalisées en réalité) ainsi que les molécules de références BH30sucMan et son témoin le BH30sucL (complètement fonctionnalisées). En (a) est présenté le BH30SucL et en (b) la molécule Boltorn de 3^{ème} génération fonctionnalisée par (c) le mannose ou par (d) le 1,2-Mannobioside. Même si la molécule BH30Suc1,2mimic présentée ici est complètement fonctionnalisée, lors de la synthèse cette molécule n'a pu être fonctionnalisée que partiellement c'est à dire 26 moles de 1,2-Mannobioside par mole de dendrimère Boltorn de 3^{ème} génération. Le BH30SucMan est totalement fonctionnalisé.

Un dendrimère de 3^{ème} génération a été fonctionnalisé par le 1,2-Mannobioside. Cette fonctionnalisation a été incomplète et a abouti à un glycodendrimère porteur de 26 unités 1,2-Mannobioside au lieu de 32 (voir commentaire figure.10). Néanmoins par technologie SPR (BIAcore), nous avons procédé à une étude d'inhibition de l'interaction DC-SIGN avec une piste ayant immobilisée le gp120 à un Rug de 356 RU. Ainsi, une concentration saturante de DC-SIGN EC constante (21 μ M) était au préalable incubée 1h avec une gamme de concentration de BH30Suc1,2mimic, BH30SucL', BH30SucL et BH30SucMan : 182, 156, 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μ M. Un volume de 70 μ L de chaque échantillon a ensuite été injecté sur la piste gp120 et la piste témoin à un débit de 20 μ L/min. A partir des sensorgramme obtenues, des courbes d'inhibition sont réalisées et présentées

dans la figure.11 et montre que le BH30Sucmimic inhibe 6 fois mieux l'interaction de DC-SIGN avec le gp120 par rapport au BH30SucMan. L'amélioration observée du pouvoir inhibiteur des glycodendrimères avec un ligand modifié justifie la poursuite des efforts pour aboutir à des composés totalement fonctionnalisés par le 1,2-Mannosbioside.

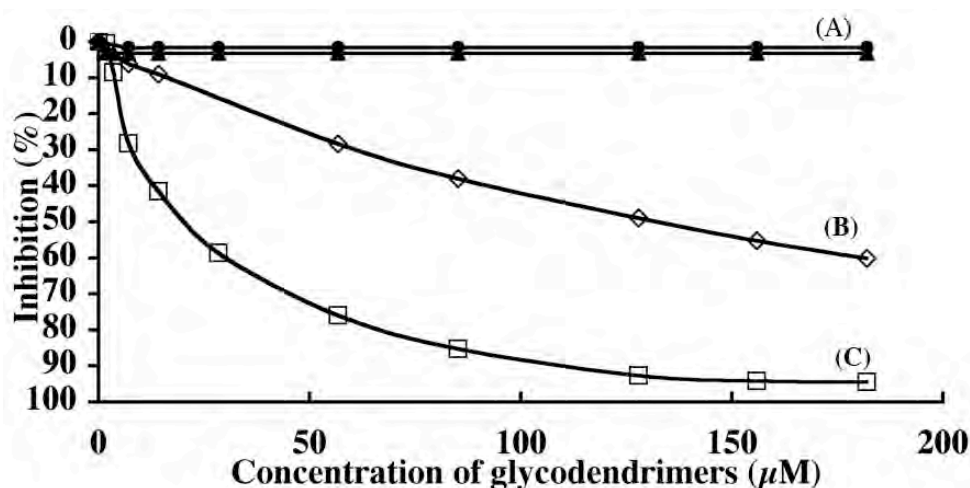


Figure.11: Courbe d'inhibition de DC-SIGN EC par les glycodendrimères et de leurs témoins sur une piste gp120 ayant un Rug de 356. La gamme de concentration choisie est : 182, 156, 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μM . (A) correspond aux 2 molécules témoins BH30sucL ayant 32 et 26 espaceurs, (B) correspond à la molécule BH30sucMan et (C) à la molécule BH30Suc1,2mimic

2.2.2.2. Le Glycomimic basé sur la structure de Lewis-X:

Après un premier ligand mimant l'interaction avec la séquence « Hight mannose » présent à la surface des virus, nous avons voulu aborder un ligand permettant une spécificité de reconnaissance entre les récepteurs homologues DC-SIGN et DC-SIGN R. (Guo et *al.* 2004).

Le trisaccharide Lewis-X est composé d'un fucose, d'un N-Acétyl-glucosamine et un galactose. La résolution de la structure de DC-SIGN CRD cristallisée en présence du trisaccharide Lewis-X (Guo et *al.* 2004) a démontré que le fucose interagit directement avec le calcium du site de fixation et le galactose réalise des interactions avec un site secondaire alors que le rôle du N-Acétyl-glucosamine est de nature conformationnelle et sert à ponter le fucose au galactose (figure.12).

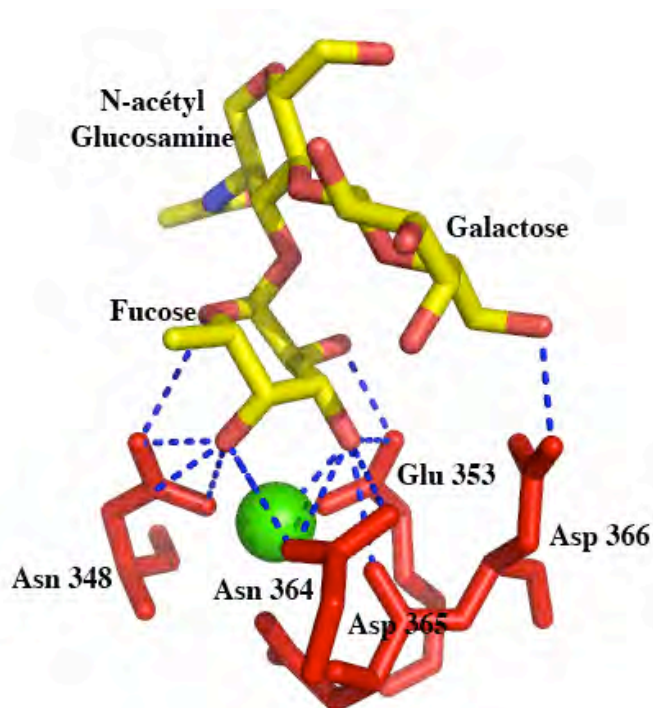
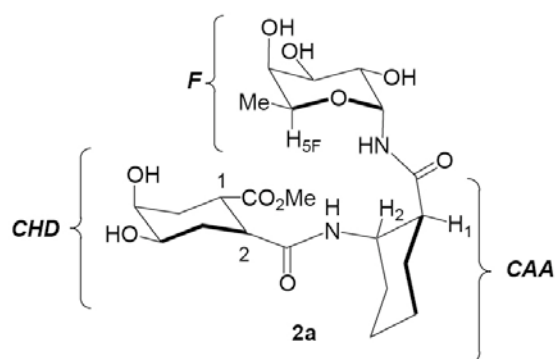


Figure.12 : Les différentes interactions réalisées entre les résidus du site actifs de DC-SIGN et le trisaccharide de Lewis-X. Le fucose interagit avec les Asn348, Asn364, Asp365, Glu353 et le galactose interagit avec l'Asp366 (PDB:1SL5).

Sur cette base, le groupe d'Anna Bernardi a préparé une molécule comportant un α -fucosylamide (comportant un fucose associé à une molécule de cyclohexendiolo) associé à un pseudo-galactose (où le cyclopyrane est remplacé par un cyclohexane) et imitant le modèle naturel du trisaccharide Lewis-X (figure.13.A). La molécule entière sera appelée le pseudo-Lewis-X.

A.



B.

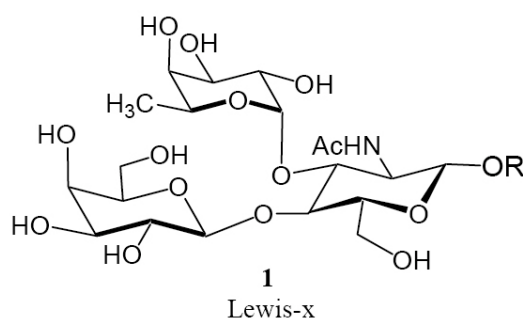


Figure.13: Schéma représentant le pseudo Lewis-X (A) et le Lewis-X (B): le CAA correspond à cis- β -aminoacid, le CDD au cyclohexendiolo et le F au fucose.

Afin d'évaluer et d'attribuer le rôle de chaque unité sucrée au sein de cette molécule synthétique, différents composés allant du monoside au composé à 3 unités ont été testés pour leurs capacités d'interaction et/ou d'inhibition vis-à-vis de DC-SIGN.

L'ensemble de ce travail est inclus dans l'article suivant : Timano G, Tabarani G, Anderluh M, Invernizzi D, Vasile F, Potenza D, Nieto P, Rojo J, Fieschi F, Bernardi A. Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an α -fucosylamide anchor. Article accepté dans le journal Chem.Biochem, sous presse). Cet article décrit la synthèse et l'analyse de l'interaction en solution de ces composés avec DC-SIGN par RMN et des études d'inhibition de l'interaction de DC-SIGN avec la surface de glycoconjuguées.

Détails des contributions au travail:

La synthèse des composés a été effectuée par le groupe d'Anna Bernardi (Milan). Les études RMN ont été réalisées conjointement par les groupes de Pedro Nieto et de Javier Rojo (Séville). Les préparations des échantillons protéiques pour les analyses RMN ainsi que les études d'inhibition des interactions DC-SIGN avec les pistes glycoconjuguées par technologie SPR (BIAcore) ont été réalisées par nos soins.

Compte tenu du degré d'implication dans ce travail, j'en suis un des co-premiers auteurs.

Ce travail décrit la 1^{ère} synthèse d'un analogue résistant aux glycosidases d' α -L-Fucosides qui sont habituellement des glycosides instables :

- La partie α -Fucosylamide du pseudo-Lewis-X produit, possède une conformation chaise stable de type 1C_4 comme l'attestent les études RMN.

- Le pseudo-Lewis-X et la partie α -Fucosylamide seule inhibent l'interaction entre DC-SIGN et une surface de glycoconjugués avec une efficacité similaire voire légèrement meilleure que le Lewis-X naturel.

- La comparaison des propriétés d'inhibition de molécules testées, montre que la partie α -Fucosylamide qui mime le disaccharide (Fucose et le N-acétyl-Glucosamine) confère la spécificité de l'interaction.

Un commentaire sur les surfaces utilisées dans cette étude pour l'analyse des constantes d'inhibition de DC-SIGN : contrairement au travail réalisé en amont où les surfaces gp120 sont utilisées, dans le cadre de cette étude nous avons utilisé des pistes BSA-Man α 1,3(Man α 1,6)Man qui ont été préalablement validées comme un outils intéressant dans les tests d'inhibition. Le choix de la réalisation de cette surface provient principalement du fait que BSA-Man α 1,3(Man α 1,6)Man est commercialisé par l'industrie Dextra alors que la gp120 est difficilement accessible.

2.2.2.3. Détermination des zones du ligand et de ces conformations impliquées dans l'interaction avec DC-SIGN:

Dans le contexte de notre réseau de collaboration, nous avons également participé à 2 autres études mais de manière plus ponctuelle. Notre rôle a été de produire des échantillons protéiques compatibles avec des expériences de RMN, c'est-à-dire en tampon deutéré. Malgré une implication très modérée de notre part, ces 2 travaux, ayant fait le sujet de 2 publications reportées dans la partie annexe, sont cités ici pour mémoire et aussi parce qu'ils constituent un pas vers des études ultérieures qui impliqueront l'équipe grenobloise plus fortement.

a) Analyse des différents dérivés di et tri-mannosylés : DC-SIGN est une lectine capable de reconnaître les séquences « High mannose » et plus particulièrement la séquence branchée trisaccharidique mannosylée. La première étude se concentre sur l'analyse des régions et des conformations de ces structures impliquées dans la reconnaissance par DC-SIGN. Ces informations seront utiles pour le développement d'un ligand inhibiteur mimic dans l'avenir. Ainsi, plusieurs unités sucrées ont été synthétisées : 3 disaccharides et deux trisaccharides. Les résultats démontrent que :

Les trisaccharides ne changent pas de conformation quand ils se fixent dans le site du CRD de DC-SIGN.

Les structures osidiques possédant le $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ ou le $\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}$ à l'extrémité terminale ont une grande affinité pour DC-SIGN.

Ce travail a fait objet d'un article accepté par Org.Biomol.Chem. : J.Reina, Diaz I, Nieto P, Campillo N, Paez J, Tabarani G, Fieschi F, Rojo J. Docking, synthesis and NMR studies of Mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN Lectin.

b) Développement d'une méthode de caractérisation des modes de fixation multiples au niveau des lectines : Il est connu chez les lectines que certains sucres sont capables d'interaction avec un site de reconnaissance donné selon plusieurs modalités différentes. Cela a été notamment rapporté dans le cas de l'interaction du $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}$ avec DC-SIGN (Feinberg et al. 2007). Dans ce cas précis, la mise en évidence par des structures cristallographiques, seul le mode de fixation majoritaire de ce sucre a pu être décrit avec précision. Notre collaborateur Pedro Nieto (Séville) a développé une méthode alternative

permettant d'analyser les interactions multiples et leurs conformations sur ce système DC-SIGN/Man α 1,2Man. Dans ce travail, le groupe de Pedro Nieto a développé une méthode d'analyse de données RMN-STD capable de déterminer les différentes conformations majoritaires et minoritaires du ligand lors de cette interaction en prenant comme exemple le ligand Man α 1,2Man.

Ce travail a fait le sujet d'un article accepté au journal Chem.Eur.J. : Angulo j, Diaz I, Reina J, Tabarani G, Fieschi F, Rojo J, Nieto P. Saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy characterization of dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN.

RESULTATS
**CHAPITRE 3 : Caractérisation biochimique et
structurale du domaine extracellulaire de DC-SIGN**

CHAPITRE 3 : Caractérisation biochimique et structurale du domaine extracellulaire de DC-SIGN

4.1. Le Contexte du travail :

Dans cette partie de ma thèse, je me suis intéressé à l'aspect biochimique et structural de DC-SIGN. Ces études ont été réalisées en se basant en prenant compte de trois éléments importants: le rôle de DC-SIGN à l'échelle cellulaire, l'importance de la région Neck de DC-SIGN dans la reconnaissance de pathogènes et le besoin d'un modèle plus précis de DC-SIGN EC pour le développement d'inhibiteurs multivalents intramoléculaires. Je détaillerai d'abord ces éléments pour ensuite introduire le travail réalisé, présenté ici joint sous la forme d'un article qui est en préparation et qui sera soumis au courant juillet.

4.1.1.DC-SIGN dans le contexte cellulaire:

DC-SIGN est une lectine capable d'interagir avec des pathogènes grâce aux profils de glycosylation de leurs glycoprotéines ou glycolipides de surface. Lors d'une exposition au VIH, DC-SIGN interagit avec le virus et une internalisation dans l'endosome précoce du complexe DC-SIGN/VIH peut se faire. À ce niveau, le virus est protégé de la protéolyse et sera transféré à travers une synapse immunologique au LT CD4⁺ induisant le processus infectieux (Arrighi et *al.* 2004, McDonald et *al.* 2003).

Ce premier mécanisme de transmission, pas encore élucidé, se fait à court terme et est défini comme une trans-infection puisque le virus, pris en charge par la DC via DC-SIGN, est transmis au LT sans un mécanisme d'infection proprement dit des DCs, en tout cas lors du premier stade de l'exposition aux VIH (Witte et *al.* 2008).

Or, des études récentes ont démontré que le VIH est capable d'infecter également la DC et permet ainsi la poursuite d'une transmission virale (Burleigh et *al.* 2006, Turville et *al.* 2004, Kwon et *al.* 2002). Ce mécanisme est reporté comme étant responsable de la deuxième phase de la transmission virale parce qu'il est important dans le maintien du processus infectieux plusieurs jours après le premier contact entre DC et le VIH (Turville et *al.* 2004). Ce mécanisme est désigné par le cis-infection où le virus pris en charge par DC se réplique au sein de cette cellule et qui eux à leur tour infecteront les LTs (Turville et *al.* 2004). Cela est dû à la présence du CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 au niveau de la surface de la DC. En effet, DC-SIGN, en interagissant avec le VIH, le transmet au CD4 et aux corécepteurs

de la même cellule (Burleigh et *al.* 2006, Lee et *al.* 2001). Ainsi, DC-SIGN aura un rôle dans la cis et la trans-infection des LTs. Le fait que la DC est plus lentement infectée que la LT CD4⁺ est probablement dû au niveau d'expression de CD4 et aux corécepteurs CCR5 et CXCR4 qui est nettement inférieur chez les DCs (De Witte et *al.* 2007). L'ensemble de ces mécanismes sont résumés dans la figure.1.

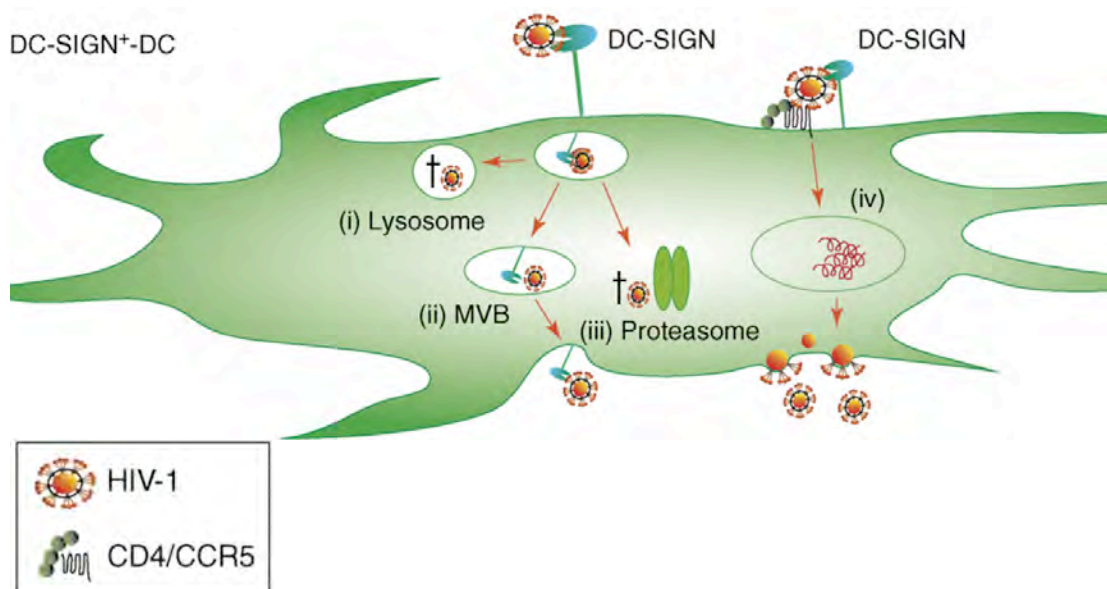


Figure.1: Un modèle du devenir du VIH-1 dans la DC proposé par de Witte et al. 2008. (i) VIH-1 est adressé aux lysosomes, conduisant à la dégradation du virus et son apprêt au CMHII. (ii) le VIH-1 est envoyé aux corps multivesiculaires (MVB), induisant la transmission du virus au LTs (trans-infection). (iii) LSP-1 interagit avec le DC-SIGN/VIH et adresse le virus à l'endosome puis au protéasome et qui conduit à l'apprêt du CMHI. (iv) DC-SIGN⁺-DCs peuvent être infectées par le VIH via le CD4/CCR5 qu'elles expriment à leurs surfaces (cis infection).

DC-SIGN est également impliqué dans l'adressage du VIH aux synapses immunologiques établies avec les LTs (Arrighi et *al.* 2004). Il a été démontré que l'interaction de DC-SIGN avec le VIH conduit à une augmentation de l'activité des rho-GTPase nécessaire pour la formation de la synapse immunologique (Hodges et *al.* 2007).

Même si une partie du VIH est transmise sous une forme active au LT, une grande partie des virus prise en charge par DC-SIGN est internalisée, dégradée et apprêtée au CMH II (Moris et *al.* 2003, Turville et *al.* 2004, Moris et *al.* 2006). Des études récentes démontrent également qu'une fois le virus pris en charge par la DC, une protéine LSP (Leukocyte specific protein) interagit avec le domaine intracellulaire de DC-SIGN et permet l'adressage du VIH au protéasome où il sera dégradé et probablement apprêté au CMH I (Smith et *al.* 2007). En effet, il a été démontré que le virus peut être présenté sous sa forme dégradée par le CMH I (Moris et *al.* 2003, Buseyne et *al.* 2001).

Bien que l'adressage du VIH via DC-SIGN au lysosome soit réel, pour le moment, il n'existe aucune preuve qui soutient l'hypothèse d'un recyclage de DC-SIGN à la surface cellulaire ou sa présence au sein des lysosomes (Engering *et al.* 2002). Pour que ce recyclage soit réalisable, il faut que le virus soit relâché par DC-SIGN dans des compartiments où règne un pH acide et que la lectine soit capable de garder son intégrité structurale tout le long de son internalisation au sein de la CD.

4.1.2. L'implication du pH dans la reconnaissance des pathogènes par DC-SIGN:

La différence majeure dans les différents compartiments endosomales par lesquelles le complexe VIH-DC-SIGN devra passer est le changement de pH : il avoisine 7,4 dans le milieu extracellulaire, 6,4 dans l'endosome précoce, 5,9 dans l'endosome intermédiaire et le 5,1 dans les lysosomes (Kwon *et al.* 2002). Des nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la diminution du pH serait à l'origine de la diminution de la reconnaissance des glycoprotéines virales par DC-SIGN (Snyder *et al.* 2005, Gramberg *et al.* 2008). Néanmoins, aucune donnée précise n'indique l'impact physico-chimique de la diminution du pH sur chaque région du domaine extracellulaire de la lectine. En effet, la reconnaissance des pathogènes par DC-SIGN n'implique pas uniquement les CRDs mais également la région Neck. Le CRD seul est un monomère qui permet une reconnaissance de faible affinité d'un sucre monovalent. Par contre, la région Neck, responsable de la tétramérisation de la protéine, permet d'augmenter l'affinité de l'interaction grâce à un mécanisme d'avidité. Ainsi, il est intéressant d'analyser l'impact du changement de pH sur l'intégrité structurale de la région Neck de DC-SIGN puisqu'elle affecte directement la reconnaissance du pathogène. Ainsi, notre équipe s'est investie dans la production la construction de la région Neck de DC-SIGN afin de tester l'effet de pH sur son intégrité structurale et oligomérique.

4.1.3. DC-SIGN ECD et le développement des inhibiteurs:

Malgré les nombreuses structures obtenues du CRD en présence ou non de structures osidiques, il n'existe pour le moment aucune structure de l'oligomère du domaine extracellulaire de DC-SIGN, le DC-SIGN EC. A ce jour, la seule approche à caractère structurale sur le domaine extracellulaire de DC-SIGN a été menée à travers des études hydrodynamiques (figure.2). Celles-ci ont conduit à une série de modèles d'états oligomériques (Feinberg *et al.* 2005).

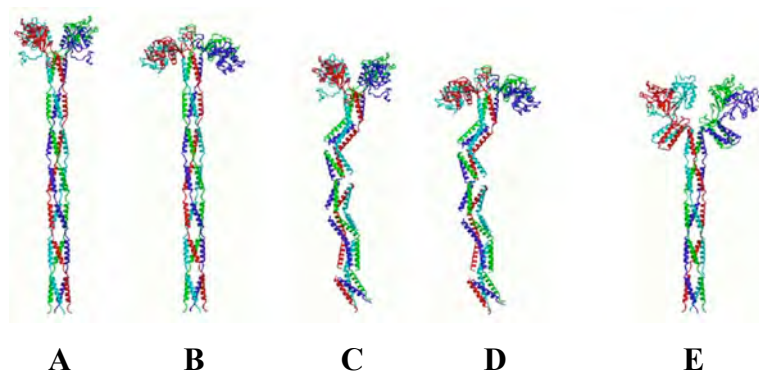


Figure.2: Les 5 modèles suggérés par Feinberg et al. 2005. Le modèle C, D et E sont privilégiés par l'auteur.

Le besoin de données expérimentales permettant d'affiner l'organisation des têtes CRD au sein du même oligomère, nous a conduit à réaliser plusieurs collectes par technique SAXS (diffusion de Rayons-X aux petits angles) sur DC-SIGN EC en collaboration avec Dominique Durand (Paris XI). Ceci a été couplé à des caractérisations biochimiques plus classiques (gel filtration, dichroïsme circulaire, ultracentrifugation analytique etc...) afin de sonder la stabilité de l'oligomère dans les différentes conditions rencontrées au sein de la cellule, principalement la variation du pH. De plus, ce travail pourra également avoir un intérêt pour le développement de molécules inhibitrices multivalentes.

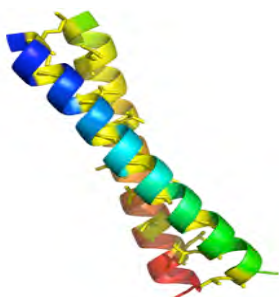
4.2. La région Neck et les interactions type coiled-coil:

Avant de détailler le travail réalisé dans ce chapitre, je présente quelques rappels sur les interactions type coiled-coil et l'organisation de la région Neck.

4.2.1. Les interactions type coiled –coil:

Les hélices alpha impliquées dans des interactions type coiled-coil sont à l'origine de l'oligomérisation de nombreuses protéines (Burkhard et al. 2001).

A-



B-

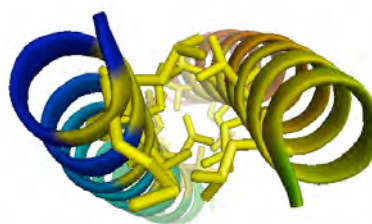


Figure.3 : Présentation de deux hélices α droites impliquées dans des interactions type coiled-coil et s'enroulant l'une sur l'autre par rotation sur la gauche (un dimère de GCN4 (PDB: 2ZTA, O'Shea et al. 1991). (A) vue de profil, (B) vue d'en haut.

Typiquement, les interactions coiled-coil consistent en 2 à 5 hélices α droites qui s'enroulent l'une autour de l'autre par rotation sur la gauche (Lupas et *al.* 1996) (figure.3).

Les séquences coiled-coil: les interactions de type coiled-coil nécessitent la présence d'un motif répété organisé en heptade (pour les coiled-coil parallèles) et capable de former une hélice alpha. Ces heptades d'acides aminés sont désignés par les lettres **abcdefg**. En prenant compte du pas d'hélice, les résidus en position **a** et **d** se trouvent rassemblés sur une face de l'hélice α (figure.4).

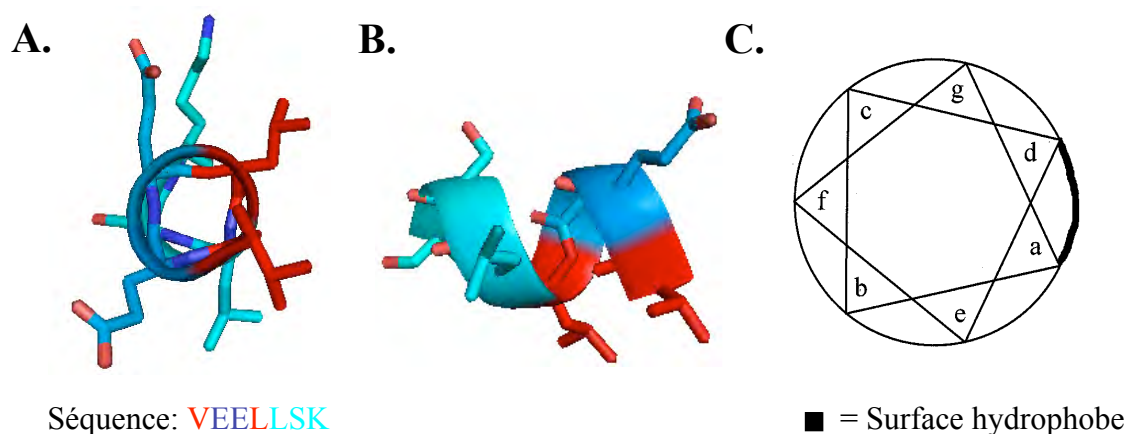


Figure.4 : Présentation d'une hélice α comportant 7 acides aminés (vue d'en haut en (A) et vue latérale en (B) ainsi qu'un schéma de la distribution des acides aminés d'une héptade sur cette hélice (en C).

D'une façon générale, les positions **a** et **d** sont occupées par des acides aminés hydrophobes et forment le cœur hydrophobe de la protéine (Zhou et *al.* 1992a, 1992 b). Quant aux positions **e** et **g**, elles comportent plutôt des acides aminés chargés qui peuvent entraîner des interactions électrostatiques répulsives ou attractives, stabilisant ou déstabilisant les interactions type coiled-coil formées (Cohen et Parry 1992). À titre d'exemple la Tropomyosine (McLachlan et Stewart 1975, Stone et *al.* 1975) ou des facteurs de transcription (Hu et *al.* 1993, O'Shea et *al.* 1991) disposent d'un pont salin interhélicale entre deux résidus chargés (Glu-Lys ou Arg-Glu) qui sont indispensables à leur tétramérisation. Cependant, de nombreuses protéines se sont avérées plus stables à pH 3, où la protonation de l'acide Glutamique évite la formation de ponts salins (Lowey 1965, O'Shea et *al.* 1992, Zhou et *al.* 1994b). Entre autres, les interactions ioniques réalisées entre la position **e** et **g** du coiled-coil ont été montrées comme responsables de la spécificité de l'oligomérisation (homo ou hétéro-oligomérisation) (Baxevanis et Vinson 1993, Graddis et *al.* 1993, O'Shea et *al.* 1993,

Schuermann et *al.* 1991). La stabilité dépend également de la longueur de la chaîne formant le coiled-coil comme il a été prouvé pour un tétramère du répresseur de Lac (Fairman et *al.* 1995).

Spécificité et la stabilité des coiled-coil: Gonzalez et *al.* ont démontré que les heptades qui possèdent en position **a** un acide aminé polaire ou chargé sont responsables de la spécificité de l'interaction entre les monomères alors que les heptades qui ont en position **a** un acide aminé hydrophobe sont responsables de la stabilité du coiled-coil (Gonzalez et *al.* 1996).

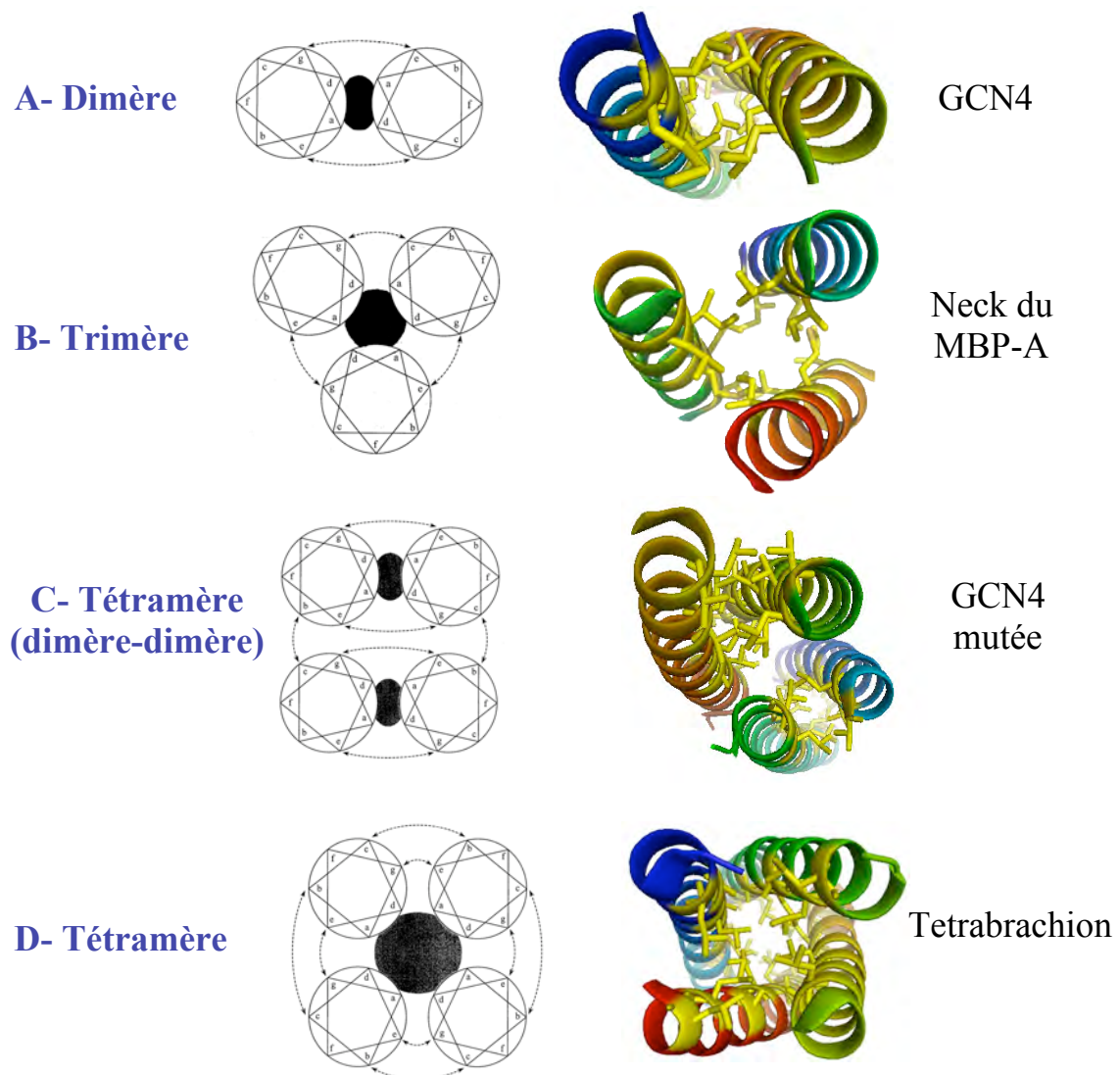


Figure.5: Quatre modèles d'organisation oligomérique différents sont présentés avec des exemples de structures protéiques résolues correspondants. (A) un dimère de GCN4 (PDB: 2ZTA, O'Shea et *al.* 1991), (B) un trimère de MBP-A (PDB:1RTM, Weis et Drickamer 1994), (C) un dimère de dimère de GCN4 mutée (PDB: 2NRN, Deng et *al.* 2007) et (D) un tétramère parallèle proprement dit de Tetrabrachion (PDB: 1FE6, Stetefeld et *al.* 2000).

Influence de la position **e** et **g** dans l'orientation du coiled-coil: les interactions coiled-coil réalisées entre les monomères permettent d'orienter leur oligomérisation. En effet, l'homo- ou l'hétéro-oligomérisation peut être parallèle ou anti-parallèle. Dans le cas d'un peptide avec une séquence qui comporte deux heptades, la première heptade est désignée par les lettres **abcdefg** et la deuxième heptade par **a'b'c'd'e'f'g'**. Les interactions parallèles nécessitent la présence d'un pont salin entre les résidus **e** et **g'** ou **g** et **e'**. Par contre, les interactions anti-parallèles impliquent la présence de ponts salins entre les résidus en position **e** et **e'** ou **g** et **g'** (Monera et *al.* 1994 et 1993).

Modèles d'interactions coiled-coil: les interactions coiled-coil sont responsables de l'organisation oligomérique de nombreuses protéines en dimère, trimère, tétramère (figure.5) et même en un ordre oligomérique supérieur. Dans le cas d'un dimère ou d'un trimères, les interactions réalisées entre les hélices α de chaque monomère de type coiled-coil s'organisent autour d'un cœur hydrophobe. Quant au modèle tétramérique, il existe deux types différents d'organisation :

- Le modèle d'interaction tétramère proprement dit avec 4 monomères où leurs hélices alpha s'enroulent autour d'un cœur hydrophobe.
- Le modèle d'interaction dimère de dimère : deux monomères interagissent entre eux par des interactions hydrophobes et avec un autre dimère par des ponts salins.

En prenant en considération le niveau d'oligomérisation de DC-SIGN, c'est les 2 modèles tétramériques qui nous intéressent dans la suite de l'étude.

4.2.2. La région Neck de DC-SIGN:

4.2.2.1. Information sur l'organisation de la région Neck de DC-SIGN:

La région Neck de DC-SIGN est composée d'un motif de 23 acides aminés répétés 7,5 fois (figure.6). Ces motifs démontrent un profil de résidus hydrophobes espacés d'un intervalle bien défini et évoquent une interaction possible de type coiled-coil (McLachlan et *al.* 1975, Stetefeld et *al.* 2000).

ab cde f g	ab cd ef g	ab cd
IYQN	LTQLKAA	VGEL SEKSK repeat 1
LQEIYQE	LTQLKAA	VGEL PEKSK repeat 2
LQEIYQE	LTRLKAA	VGEL PEKSK repeat 3
LQEIYQE	LTWLKAA	VGEL PEKSK repeat 4
MQEIYQE	LTRLKAA	VGEL PEKSK repeat 5
QQEIYQE	LTRLKAA	VGEL PEKSK repeat 6
QQEIYQE	LTRLKAA	VGEL PEKSK repeat 7
QQEIYQE	LTQLKAA	VERL repeat 8

Figure.6: Présentation des 7,5 motifs répétés de la région Neck de DC-SIGN (région 66-252). On note par **abcdefg** les acides aminés d'un motif répété en heptade responsable de l'interaction coiled-coil.

A cela s'ajoute le travail de Mitchell qui démontre, par soustraction du spectre de dichroïsme circulaire (CD) d'ECD par celui du CRD, que le spectre de la région Neck a le profil typique d'une organisation en hélice α (Mitchell et al. 2001). De plus, la résolution de la structure du domaine CRD avec une partie du 8ème motif répété de DC-SIGN R, un homologue de DC-SIGN, démontre l'organisation en hélices alpha de ce motif (figure.7).

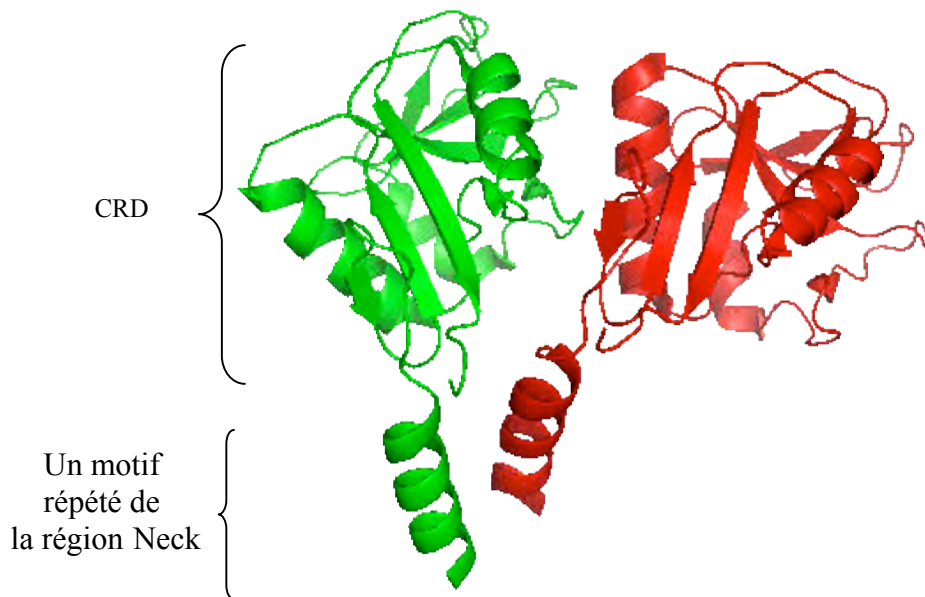


Figure.7: La structure du CRD avec un motif répété de la région Neck de DC-SIGN R. (PDB:1XPH, Snyder et al. 2005).

Il a été démontré que la longueur de la zone d'interaction coiled-coil peut influencer le niveau d'oligomérisation (Fairman et al. 1995). Des constructions protéiques de DC-SIGN et de DC-SIGN R ont été réalisées avec un nombre variable de motifs répétés au sein de la séquence Neck (Feinberg et al. 2005). Il s'est avéré que le nombre de motifs répétés de 23

acides aminés est crucial dans le maintien de l'état oligomérique, et cela est d'aussi vrai pour DC-SIGN que pour DC-SIGN R. En effet, la suppression de 2 motifs répétés en N-terminal du domaine extracellulaire de DC-SIGN conduit à un équilibre dimère-tétramère. La suppression de 5,5 motifs conduit à un équilibre dimère/monomère et la perte de 7 motifs forme un monomère (figure.8). Ces résultats permettent encore une fois de plus de suggérer l'hypothèse d'une interaction coiled-coil au sein de la région Neck.

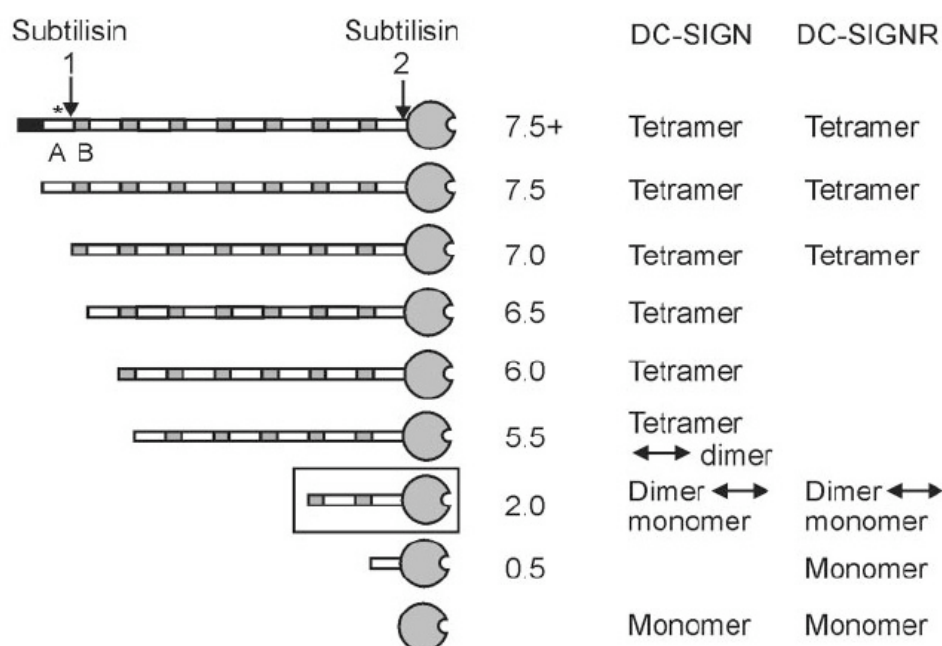


Figure.8: Les différentes constructions tronquées de DC-SIGN R et EC réalisés par Feinberg et al. 2005.

[4.2.2.2. Construction protéique de la région Neck de DC-SIGN : importante, dure... et ignorée.](#)

Plusieurs équipes qui travaillent sur DC-SIGN ont publié des résultats attestant que la reconnaissance du sucre par le domaine de reconnaissance CRD est altérée avec la chute du pH (Snyder et al. 2005, Gramberg et al. 2008). Une de ces équipes atteste, avec une expérience de BIAcore sommaire, de la stabilité du tétramère de DC-SIGN à la variation du pH (Snyder et al. 2005). Ainsi, la croyance générale est que la perte de reconnaissance est dû uniquement à une désensibilisation de la part du CRD vis-à-vis du sucre. Cette absence d'investigation sur la région Neck de DC-SIGN est due principalement à deux raisons différentes :

- Comme la région Neck dispose de 7.5 motifs répétés au sein de sa séquence, il est possible donc de croire que la présence du CRD est indispensable pour le bon alignement de ces motifs répétés lors de l'oligomérisation du domaine EC.

- La difficulté d'obtenir des fragments de la région Neck seule, puisque la répétition des séquences se retrouve au niveau nucléique et empêche la conception d'amorces spécifiques d'un motif par rapport à un autre.

Il est à noter que, pour le moment, il n'existe pas un travail publié centré sur une caractérisation biochimique de la région Neck pour cette grande famille de lectines de type C.

Détails sur les contributions au travail :

La production et la purification des différentes constructions ont été réalisées par nos soins. J'ai également réalisé des études d'état oligomérique en fonction des différents paramètres physico-chimiques (pH et force ionique), conduit des expériences d'ultracentrifugation analytique et participé à des collectes de données SAXS. L'analyse des données d'ultracentrifugation analytique a été menée avec l'aide de David Stroebel et les données SAXS analysés par Dominique Durand.

Michel Thepaut, de notre équipe, a réalisé le modèle structural en accord avec ces données SAXS.

Le travail réalisé met en avant les observations et les conclusions suivantes :

- Lors de la purification de DC-SIGN Neck sur gel filtration, deux pics ont été observés sur le chromatogramme correspondant à deux états oligomérique de la protéine (monomère et tétramère).

- Il existe un équilibre entre la forme monomérique et tétramérique de la protéine DC-SIGN Neck.

- L'état tétramérique de DC-SIGN Neck est maintenu grâce à des interactions type coiled-coil autour d'un cœur hydrophobe, éliminant ainsi le modèle d'interaction dimère de dimère.

- L'intégrité structurale de DC-SIGN Neck et EC est affectée par la variation du pH et influence ainsi l'état oligomérique de la protéine. Ceci aurait donc un effet sur le mécanisme de reconnaissance multivalent d'une structure osidique.

- Au-delà du Neck, le pH affecte également la structure du CRD lui-même.

- Une enveloppe SAXS du domaine extracellulaire de DC-SIGN a été obtenue soulignant le caractère très étendu de ce récepteur avec une dimension de l'ordre de 320Å.

- Un modèle structural de DC-SIGN tétramérique en bonne adéquation avec les données SAXS a pu être proposé.

- Ce travail suggère que les têtes CRDs doivent être en position relevée afin de pouvoir être bien placées dans l'enveloppe obtenue par SAXS.

RESULTATS
CHAPITRE 4: Mise au point de pistes orientés de
DC-SIGN

CHAPITRE 4 : Mise au point d'une piste orientée

L'étude précédente a mis en évidence un problème au niveau de l'état oligomérique de DC-SIGN sur les pistes ayant immobilisées la lectine par couplage covalent. En effet, dans le papier, on met en avant l'aspect multivalent de l'inhibiteur qui n'est pas affecté par cette découverte puisque l'augmentation de la densité du CRD sur les pistes abouti à une augmentation du taux de molécules inhibitrices fixées. Ceci est dû au fait qu'à haute densité, les CRDs sont proches dans l'espace et permettent ainsi d'obtenir une interaction impliquant plusieurs têtes CRDs pour une molécule testée. En parallèle, la capacité de ces molécules à réaliser de pontage entre récepteur tétramérique était validée par ultracentrifugation analytique. Ainsi, malgré le problème d'homogénéité de ces surfaces, les données requises sur la multivalence sont tout à fait valables. Cependant la mise en évidence de ce phénomène de déstabilisation du tétramère à pH acide nous conduit à vouloir améliorer et optimiser nos outils pour les futures études d'interactions DC-SIGN/ligand et pour aller vers des systèmes ligands mimant au plus prêt les surfaces cellulaires. Les deux paramètres à prendre en compte seraient alors : le maintien de la structure tétramérique et la présentation orientée de ce récepteur.

1. Introduction sur les pistes orientées et non orientées:

La technique SPR BIAcore permet d'étudier l'interaction entre un ligand fixé sur une piste et un analyte présent en phase liquide. Ce ligand peut être fixé d'une façon orientée ou non orientée.

Dans le cas d'une immobilisation directe des protéines sur une piste de Dextran, les protéines devraient être injectées en présence d'un agent (EDC+NHS) qui réalise un couplage entre les groupes carboxyliques de la piste et les groupes amines des lysines accessibles à la surface de la protéine. Pour permettre ce pontage, la protéine doit être chargée positivement pour faciliter son interaction initiale avec la matrice de dextran chargée négativement. Ainsi, pour cette étape, la protéine doit être injectée dans des conditions de pH inférieures à son point isoélectrique (pI). Dans le cas de DC-SIGN EC disposant d'un pI de 5,4, un pH acide est nécessaire lors du couplage. C'est le point qui pose un problème technique vis-à-vis de la notre protéine. De plus, une protéine disposant de nombreux résidus Lysine accessibles pourraient se fixer par différents points de contact aux COOH de la piste. Ainsi, aucune

orientation n'est privilégiée lors de l'immobilisation de la protéine sur les pistes. Ces surfaces sont alors désignées comme des pistes non orientées (figure.1).

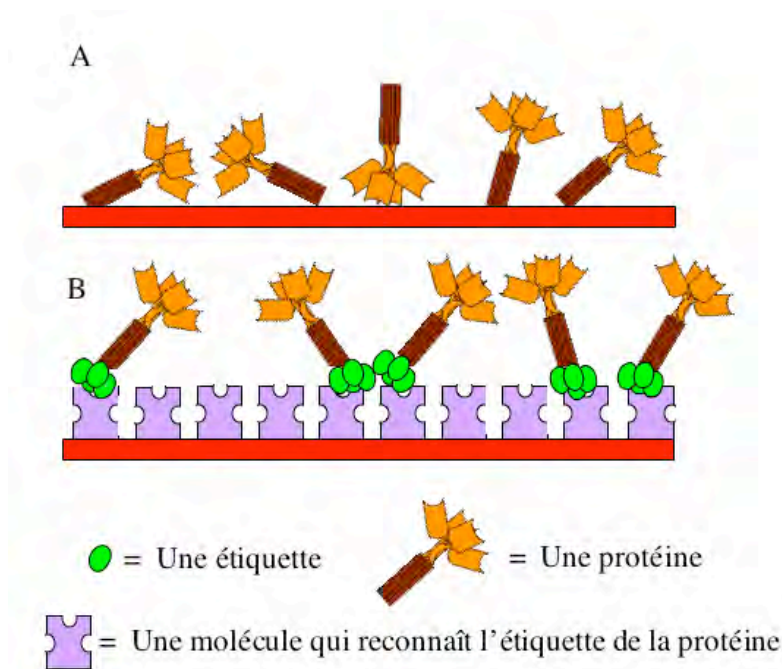


Figure.1 : la différence entre les pistes qui fixent une protéine d'une façon non orientée et orientée. (A) la protéine est directement immobilisée sur la piste par ses différents résidus Lysines présent à sa surface, (B) la piste, ayant fixé auparavant une molécule capable de reconnaître l'étiquette associée à une protéine capture cette dernière par son étiquette.

Afin de palier à tous ces problèmes, plusieurs groupes ont eu recours à des méthodes de fixation impliquant des étiquettes en position C ou N-terminal de la protéine, appelées « Tag ». La stratégie consiste à immobiliser sur une piste de dextran, d'une façon covalente ou non, une protéine-récepteur ou une molécule chimique qui reconnaît avec une bonne affinité l'étiquette associée à la protéine ligand. Suite à cela, la protéine étiquetée sera injectée sur la piste dans des conditions où sa stabilité structurale et fonctionnelle est optimale et sera ainsi capturée par son récepteur à la surface (figure.1).

L'étiquette la plus utilisée est le tag 6-Histidines associé à une protéine d'intérêt. Il existe des surfaces Ni-NTA commercialisé par la compagnie BIAcore permettant l'immobilisation des protéines étiquetées par des tag 6-Histidines d'une façon Ni^{2+} dépendante. Or, ce type d'étiquetage pose un problème lors d'une étude BIAcore réalisée pour des lectines de type C. En effet, les lectines de type C reconnaissent les sucres d'une façon calcium dépendante. Immobilisées sur les pistes, les lectines en présence de calcium devront fixer les sucres, qui leur sont spécifiques, présent dans le tampon de course.

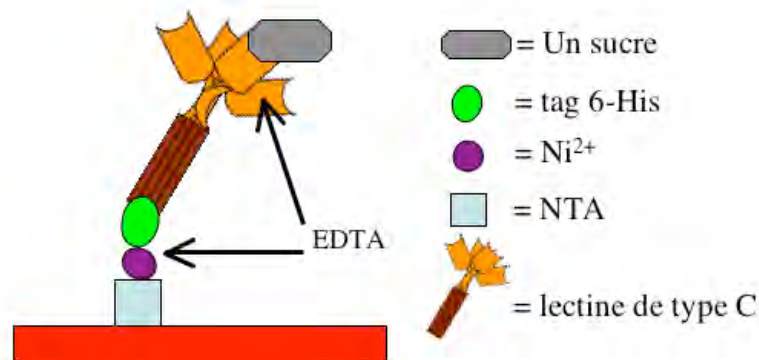


Figure.2 : Effet de l'EDTA sur une piste Ni-NTA associée au 6-His tag d'une lectine de type C. L'interaction entre le tag et la protéine est Nickel dépendant, l'interaction entre le sucre et la lectine de type C est calcium dépendante.

Le problème se pose quand ces surfaces ayant fixé le sucre d'une façon dépendante du calcium devront être régénérées pour réutiliser de manière cyclique la surface. En effet, pour la régénération de ces surfaces fonctionnalisées, l'EDTA est injecté sur les différentes pistes. Son rôle est de chélater les ions divalents, et plus particulièrement le calcium dans le but de supprimer l'interaction de la lectine avec le sucre. Après élimination du ligand, la surface est remise en calcium et la fonctionnalité régénérée pour l'interaction suivante. Or, dans le cas d'une surface Ni-NTA fixant la lectine par son tag 6-Histidines, l'EDTA va également chélater le Ni^{2+} supprimant ainsi l'interaction de la lectine avec la surface de la piste. Ainsi, l'EDTA décrochera le sucre de la lectine, et la lectine de la surface d'immobilisation (figure.2).

Pour remédier à des tels problèmes, une nouvelle classe de peptides « tags » ayant une spécificité pour la streptavidine a été utilisée. Ces étiquettes, appelées Strep-tagX, ont été développées au départ pour purifier des protéines sur colonne Streptavidine.

2. Les Strep-tags et la Streptavidine/Strep-Tactine:

La Streptavidine est une protéine tétramérique de 53 kDa retrouvée dans les bactéries *Streptomyces avidinii*. Elle agit comme un récepteur spécifique de la biotine. En effet, la Streptavidine peut lier 4 moles de biotine par mole de protéine, et à l'échelle monovalente présente une interaction de haute affinité ($k_d \sim 10^{-15}$ mol/L) la classant parmi les interactions non-covalentes les plus fortes (Wilchekand & Bayer 1989). Cela pose un problème puisque l'interaction biotine–Streptavidine est difficilement réversible, ainsi il a fallu développer un autre ligand qui soit reconnu par la streptavidine avec une moindre affinité et permettant ainsi la réversibilité de l'interaction. Une séquence de 8 résidus remplissant cet objectif a été isolé.

Le développement de ce type de Strep-tag est basé sur les observations de Devlin et *al.* (1990) and Lam et *al.* (1991). En effet, les auteurs ont découvert que le plus petit motif reconnu par la Streptavidine est composé de 3 acides aminés (NH₂-His-Pro-Gln(Met,Asn)-COOH). Cependant, il a été impossible d'utiliser ce peptide pour les purifications puisqu'il possède une faible affinité pour la Streptavidine (Weber et *al.* 1992). En 1993, Schmidt et Skerra ont tenté d'optimiser des conditions d'utilisation afin que ces « tags » puissent être envisageables (Schmidt and Skerra 1993 et 1994). Cependant, cette optimisation demeurait imparfaite puisque les résultats dépendaient du type de protéine-fusion utilisé dans les études. Ce n'est qu'en 1996, que Schmidt a démontré que le meilleur peptide reconnu par la Streptavidine, désigné par le Strep-tag O, était composé de 8 acides aminés (NH₂-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly-COOH). Cependant, le Strep-tag O peut être utilisé uniquement quand il est placé en C-terminal de la protéine recombinante. En effet, il a été démontré que le groupe carboxylique terminal du Strep-tag O est capable de réaliser une interaction ionique avec l'arginine présente dans le site de fixation de la Streptavidine (Schmidt et *al.* 1996).

Pour une utilisation générale, la séquence peptidique NH₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH, appelée Strep-tag II s'est avérée plus adaptée puisqu'elle peut être utilisée indépendamment de son emplacement au sein de la protéine-fusion. Le Strep-tag II est une étiquette courte, biologiquement inerte, non protéolysable et n'interfère pas dans la translocation vers les membranes ou le repliement des protéines (Schmidt & Skerra 2007). Néanmoins, l'affinité Strep-tag II pour la Streptavidine était plus faible que celle mesurée pour le Strep-tag O (Schmidt et *al.* 1996). C'est pour cette raison que la streptavidine a été optimisée par mutagenèse afin d'améliorer son affinité pour le Strep-tag II (Skerra et *al.* 1997). Ces molécules de Streptavidine mutées sont commercialisées sous le nom de Strep-Tactine par la société IBA. L'interaction Strep-tag II/Strep-Tactine possède un K_d de l'ordre de 1µM (Voss & Skerra et *al.* 1997) alors que celle de Strep-tag O/streptavidine est de 37µM (Schmidt et *al.* 1996). Une telle affinité (1µM) n'est pas très forte mais suffisante pour permettre des applications de chromatographie d'affinité où il faudra pouvoir décrocher la protéine d'intérêt.

[3. La réversibilité de l'interaction de Strep-tag II/Strep-Tactine:](#)

La purification d'une protéine fusion nécessite que l'interaction réalisée entre l'étiquette et son récepteur soit réversible dans des conditions qui ne nuisent pas à la structure ou au fonctionnement de la protéine. Ainsi, il a été élaboré des résines associées à la Strep-Tactine (société IBA) capable d'interagir d'une façon réversible avec le Strep-tag II présent

au niveau des protéines fusion. Cette réversibilité va permettre l'élution de la protéine fusion. En effet, en utilisant un compétiteur qui ressemble à la biotine, la Desthio-biotine, le Strep-tag II serait en mesure de se décrocher de la résine. L'étape suivante consiste alors à régénérer la résine associée au Strep-Tactine en ayant recours à un autre compétiteur. Il s'agit de l'acide hydroxyphenylazobenzoïque (HABA) qui lui est ensuite éliminé par un simple lavage.

4. Mise au point des pistes orientées Strep-Tactine/ Strep-tag II:

4.1. Immobilisation de la Strep-Tactine:

Afin de mettre au point des pistes orientées avec les constructions protéiques étiquetées au Strep-tag II, il a fallu au départ immobiliser les tétramères de Strep-Tactine sur la surface de dextran. Cette immobilisation est réalisée en utilisant le mélange EDC+NHS (50:50) comme agent de couplage entre les groupements carboxyliques de la piste et les groupements amines présents à la surface de la Strep-Tactine. L'éthanolamine et l'HCl sont ensuite injectés à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ comme précédemment décrit dans la partie « matériels et méthodes ». L'étape supplémentaire qui distingue les pistes orientées des pistes non orientées, est l'injection de 30 μL du mélange 50mM NaOH et 1M NaCl. Cette étape finale est importante pour enlever toutes les interactions non spécifiques réalisées entre des contaminants potentiels et les sites de fixation des Strep-Tag II au niveau de la Strep-Tactine immobilisée. Au final, il faut injecter 150 μL du Strep-Tactine (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur les 2 pistes d'une puce CM5 pour avoir une densité de 18000 RU. Les pistes CM5 permettent une immobilisation protéique à haute densité (figure.3).

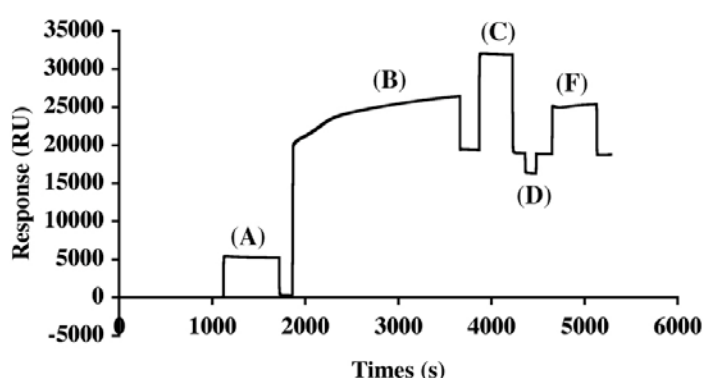


Figure.3: Exemple typique d'une immobilisation du Strep-Tactine sur une piste CM5. (A) correspond à l'injection de 50 μL d'un mélange d'agents de couplage EDC+NHS (50 :50) ; (B) correspond à l'injection de 150 μL de la protéine Strep-Tactine (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ; (C) correspond à l'injection de 30 μL d'éthanolamine ; (D) correspond à l'injection de 10 μL d'HCl 10mM ; (F) correspond à l'injection de la solution 50mM NaOH supplémentée de 150mM NaCl.

4.2. Phase de capture:

Les protéines utilisées: DC-SIGN SNeck ou SEC (S désigne le Strep-tag II) sont des protéines tétramériques possédant une étiquette Strep-tag II par monomère. Donc, un tétramère de Neck ou de SEC aura 4 « tags », ainsi, un phénomène de multivalence devrait être observé entre les quatre Strep-tag II de DC-SIGN SNeck/SEC et les molécules de Strep-Tactin présent en très haute densité sur cette piste. Une forme dimérique artéfactuel de DC-SIGN SCRD possédant une étiquette Strep-tag II par monomère (voir chapitre 1 des résultats) a été également utilisée pour analyser le comportement de la piste de Strep-Tactine puisque un CRD monomérique ne s'accroche pas à ces pistes et ne sera donc pas exploité dans la suite des analyses. Ce CRD dimérique présentant deux « tags » permettra de vérifier le phénomène d'avidité à un niveau intermédiaire par rapport au EC ou au Neck (tétramérique).

Protocole utilisé: Sur la piste ayant immobilisée la Strep-Tactine, 100 μ L de DC-SIGN SNeck/SEC/SCRD (60 μ g/mL) ont été injectés à un débit de 5 μ L/min. Les sensorgrammes montrent la phase d'association et de dissociation de la protéine (figure.4). La piste Strep-Tactine reconnaît avec une meilleure affinité le tétramère de DC-SIGN SEC que le dimère de DC-SIGN SCRD puisque la phase de dissociation est moins marquée sur la piste SEC que sur la piste SCRD. Le DC-SIGN SNeck se comporte à l'identique de DC-SIGN SEC. Afin de vérifier que la dissociation n'est pas due à une interaction entre le CRD de DC-SIGN avec la matrice dextran de la puce (polyglucose), une injection de 20 μ L d'EDTA 50mM est réalisée sur la piste SCRD. L'absence de changement dans la cinétique de dissociation de la courbe à la fin de l'injection de l'EDTA indique que cette phase de dissociation importante observée chez le SCRD est uniquement liée à la plus faible interaction entre le dimère du Strep-tag II de cette construction et la piste Strep-Tactine (figure.4).

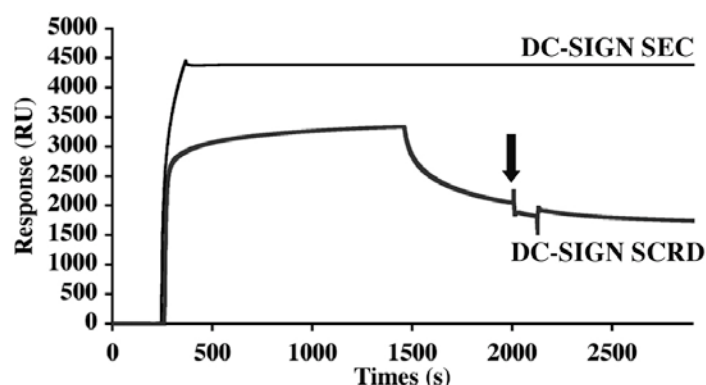


Figure.4: Tracés des deux sensorgrammes lors de la capture de DC-SIGN SCRD et SEC par la piste Strep-Tactine grâce à leurs étiquettes Strep-tag II (traité par le logiciel BIAeval). La flèche noire correspond à l'injection de 20 μ L d'EDTA 50mM sur la piste Strep-Tactine ayant capturé DC-SIGN SCRD dimérique.

4.3. Analyse de la stabilité:

Afin d'analyser la stabilité de la densité des pistes suite à la phase de capture, cette dernière était suivie d'un lavage à haut débit (Prime) avec le tampon de course. Avec un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (élevé en BIAcore), on observe une diminution avec une pente de 9 RU/seconde de la ligne de base du SCRD dimérique. Le même test avec les protéines S-Neck ou SEC donne une pente de 0,005RU/seconde témoignant d'une très grande stabilité de la surface. Ainsi, à l'échelle de temps d'une expérience BIAcore, il n'y a pas de fuite significative par décrochage des protéines SNeck ou SEC. Cela peut être sûrement corrélé à un mécanisme de multivalence plus fort chez les protéines tétramériques que les dimérique. Ainsi, les densités des pistes orientée DC-SIGN SCRD et SEC finale étaient respectivement 1800 et 4800 RU.

4.4. Analyse de la fonctionnalité et de l'interaction réversible des sucres avec les pistes SCRD et SEC:

Cette analyse n'inclut pas la piste SNeck puisque cette construction protéique ne possède pas le domaine de reconnaissance des sucres (CRD) et sera donc incapable d'interagir avec le sucre. Dans cette partie d'étude, le débit est fixé à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ainsi, 70 μL de BSA-(Mannose)₁₅ (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ont été injectés sur les pistes SCRD et SEC et une piste témoin (qui ne comporte que du Strep-Tactine immobilisé à la même densité). Les sensorgrammes soustraits de la piste témoin démontrent la présence d'une interaction de l'ordre de 100 RU pour la piste SCRD et de 1000 RU pour le SEC. Afin de régénérer la piste en libérant le sucre du domaine de reconnaissance de sucre, 20 μL d'EDTA (50mM) ont été injectés sur les 2 pistes. Le retour à la ligne de base permet d'affirmer la qualité de la régénération de ces pistes (figure.5).

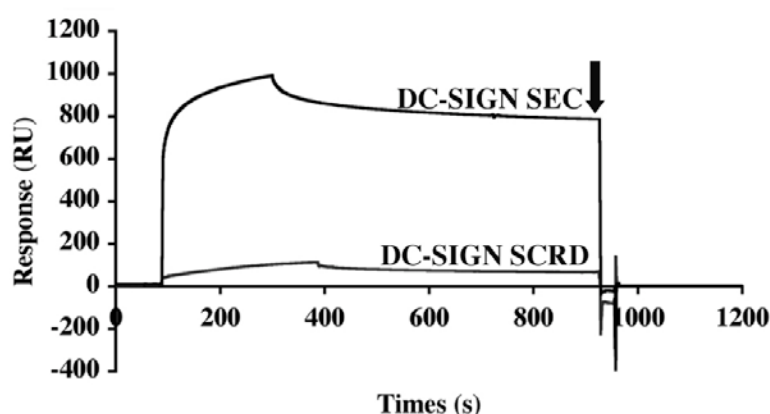


Figure.5: Les Sensorgrammes correspondant aux réponses obtenues suite à l'injection du BSA-(Man)₁₅ sur les pistes DC-SIGN SCRD et SEC, soustraites de la réponse de la piste témoin. La flèche noire correspond à l'injection de 20 μL d'EDTA sur les 2 pistes (traitement par le logiciel Bioeval).

4.5. Régénération des pistes Strep-Tactine pour une nouvelle «phase de capture»:

Le problème majeur rencontré chez de nombreux utilisateurs de la technique SPR est la réutilisation d'une même piste à plusieurs reprises tout en immobilisant à chaque fois un analyte circulant différent. Au départ, en réalisant le protocole déjà utilisé pour régénérer les colonnes de Strep-Tactin, une injection d'une solution comportant 150mM NaCl, 25mM Tris-HCl, 1mM EDTA et 2.5mM D-desthiobiotine est effectuée sur la piste orientée de DC-SIGN SEC à un débit de 20 μ L/min. Cette injection devrait alors suffire pour décrocher la protéine fixée par son Strep-tag II de la piste Strep-Tactin. Cependant, seul le quart de la densité fixée s'est détaché lors de l'injection de 10 μ L et puis de 30 μ L dans le tampon de course. Pourtant, une injection de 30 μ L de NaOH 50mM permet de régénérer complètement la piste (figure.6). Ainsi, en prenant compte du facteur temps et du coût, nous avons choisi dans les expériences futures de régénérer avec du NaOH les pistes orientées.

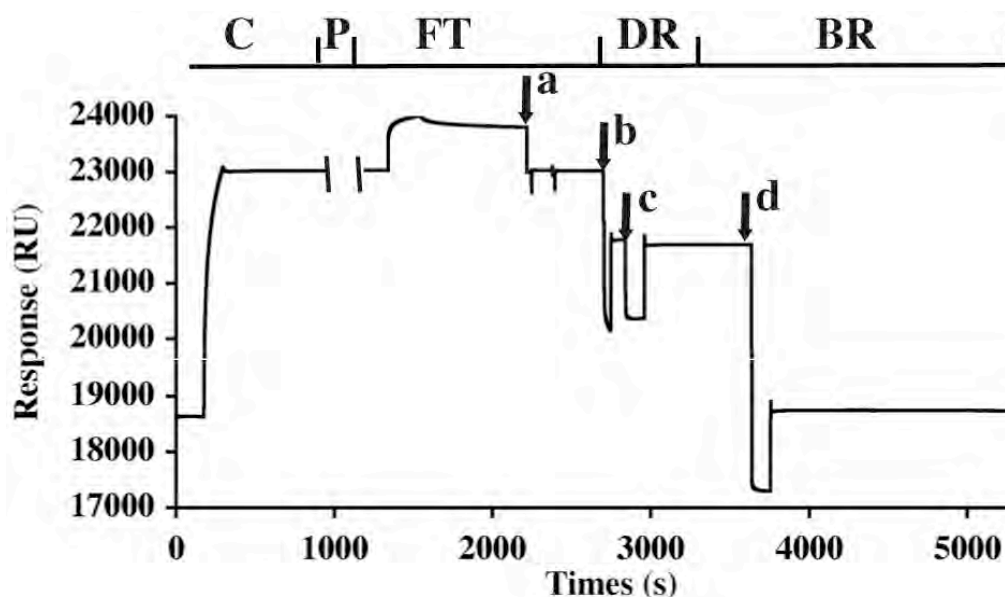
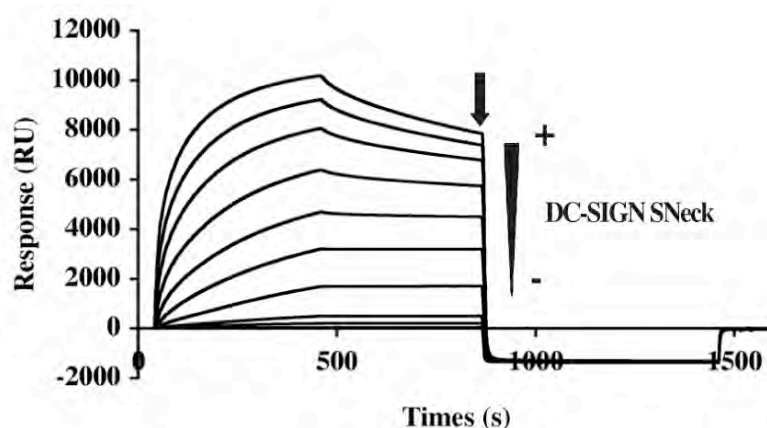


Figure.6: Sensorgramme réalisé pour la piste orientée de DC-SIGN SEC où toutes les étapes d'études sont présentées. Le C : la phase de capture des DC-SIGN Sec par la Strep-Tactin déjà immobiliser sur la piste, le P : prime (ou lavage) de 6 minutes réalisé juste après la capture de DC-SIGN SEC, le FT : test de fonctionnalité où 70 μ g/mL de BSA-mannotriol (60 μ g/mL) sont injectés, DR : la phase de régénération par 2,5mM de Desthiobiotine, BR : la phase de régénération basique avec du NaOH injecté. Les flèches noires correspond aux injections réalisées (a) correspond à l'injection de 20 μ L d'EDTA 50mM pH 8, (b) à l'injection de 10 μ L de 2,5mM Desthiobiotine, (c) à l'injection de 30 μ L de 2,5 Desthiobiotine et (d) à l'injection de 30 μ L du NaOH 50mM.

4.6. Etude de la reproductibilité et de la spécificité de l'interaction entre le Strep-tag II et la piste Strep-Tactine:

Après avoir obtenu une faible régénération de la piste DC-SIGN SEC en utilisant un compétiteur du Strep-Tag II, la question était de savoir si cette interaction réalisée entre la protéine et la piste était bien effectuée par l'intermédiaire du Strep-Tag II.

A



B

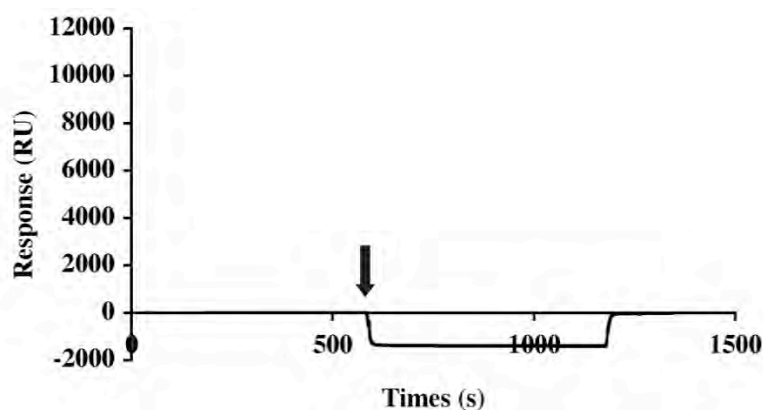


Figure.7: (A) Sensorgramme obtenu après injection d'une gamme de DC-SIGN SNeck sur une piste Strep-Tactine. (B) Sensorgramme obtenu après injection d'une gamme de DC-SIGN Neck sur une piste Strep-Tactine. La flèche en noir indique le moment où il y a eu injection de 30 μ L de NaOH 50mM.

Ainsi, une gamme de concentrations identiques de DC-SIGN SNeck, avec Strep-tag II, et de DC-SIGN Neck, sans Strep-tag II, a été injectée sur la même piste Strep-Tactine: 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78, 0.39, 0.195, 0.0095 μ g/mL. Une injection de 40 μ L de chaque concentration de protéines est réalisée à un débit de 20 μ L/min avec une injection de 30 μ L de NaOH 50mM entre chaque injection de protéine. Les courbes sont ensuite traitées par le logiciel BIAeval. Il s'agit d'un logiciel qui permet de normaliser les courbes par rapport à une même ligne de base (figure.7).

Les résultats démontrent que l'interaction entre la piste Strep-Tactine et la protéine n'a lieu que si celle-ci possède le Strep-Tag II confirmant ainsi la spécificité de l'interaction via l'étiquette mais également de la reproductibilité de la régénération des pistes.

4.7. Comparaison entre la piste orientée DC-SIGN SEC et non orientée DC-SIGN EC:

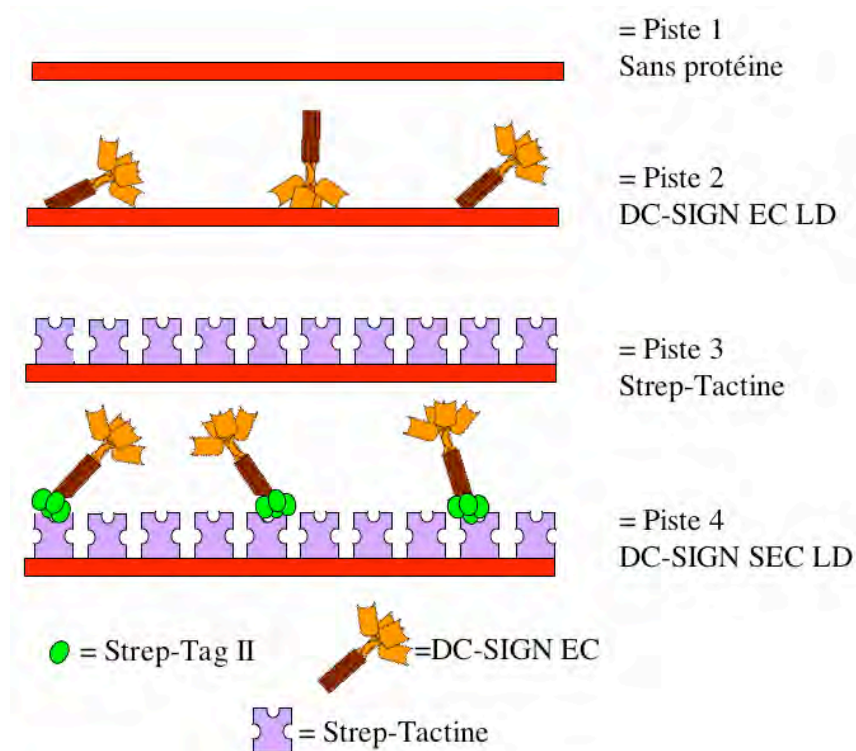
Dans toute cette partie consacrée au test des molécules multivalentes sur une piste orientée, la gamme de concentrations est fixée à 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 , 0.89 et 0.45 μ M.

Dans cette étude, la piste 1 est une piste témoin ou aucune protéine n'a été immobilisée. La piste 2 correspond à la piste où la protéine DC-SIGN EC est fixée directement par pontage covalent à une densité de 750 RU, elle sera appelée piste **DC-SIGN EC LD** (pour low density). La piste 3 correspond à la surface fixant la Strep-Tactine uniquement alors que la piste 4 correspond à la piste ayant fixé le Strep-Tactine à la même densité que celle de la piste 3 et ayant en plus capturé du DC-SIGN SEC jusqu'à une densité de 800RU. Cette piste fonctionnalisée à une faible densité sera appelée piste **DC-SIGN SEC LD** (figure.8).

Une injection de 70 μ L de BSA-(Mannose)₁₅ (60 μ g/ml) démontre que les pistes 2 et 4 présentant du DC-SIGN sont bien fonctionnelles. Dans tous les traitements des sensorgrammes obtenus, la réponse des pistes 1 et 3 est soustraite respectivement de celle des pistes 2 et 4. En effet, la réponse des pistes 1 et 3 reflète l'interaction non spécifique entre les molécules ligands à tester d'une part et le dextran ou la surface Strep-Tactine d'autre part.

Une autre puce CM5 a servi pour réaliser les mêmes pistes excepté que les pistes 2 et 4 ont des densités de DC-SIGN EC/SEC plus importantes. Les nouvelles piste 2 et 4 disposent ainsi respectivement des densités de 4600 RU de DC-SIGN EC et 4800 RU de DC-SIGN SEC. Ainsi, elles seront appelées pistes DC-SIGN EC HD et DC-SIGN SEC HD, avec HD pour haute densité (figure.8).

A



B

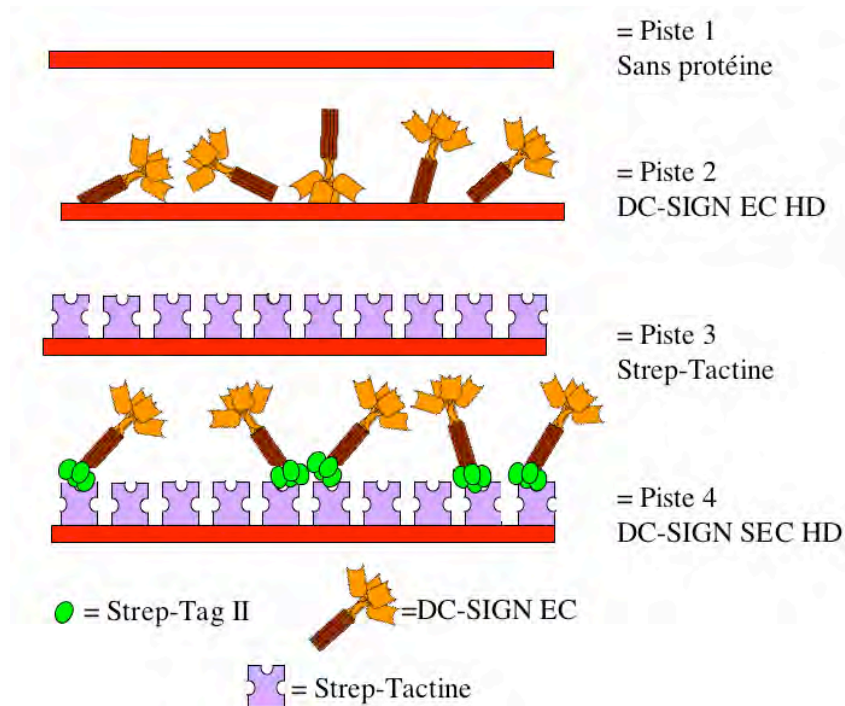
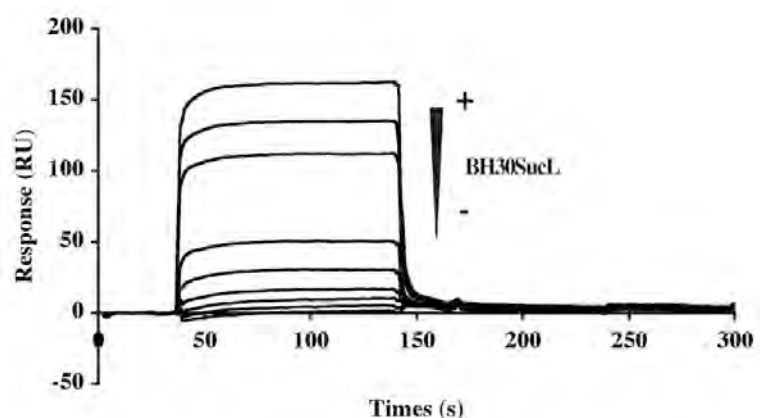


Figure.8 : Représentation schématique des 2 puces utilisées pour les études comparatives des pistes DC-SIGN EC/SEC orientées et non orientées. (A) correspond à la puce 1 et elle dispose de 4 pistes: piste 1 correspond à 150 RU EDC+NHS et sans protéine immobilisée, piste 2 à DC-SIGN EC LD non orientée (750RU) , piste 3 à la piste Strep-Tactin (18000RU) et piste 4 à DC-SIGN SEC LD orientée (800 RU). (B) correspond à la puce 2 et elle possède les même pistes 1 et 3. La piste 2 correspond à DC-SIGN EC HD non orientée (4600 RU) et la piste 4 à DC-SIGN SEC HD orientée (4800 RU).

On dispose donc à ce stade deux différents jeux de pistes fonctionnalisées non-orientées à basse et haute densité de DC-SIGN qui sont en tout point comparables à celles qui sont utilisées dans la publication qui initie ce travail de thèse. En parallèle, nous disposons des pistes orientées à basse et haute affinité de DC-SIGN. J'ai comparé les propriétés de ces 2 séries de pistes avec le ligand BH30(SucMan)₃₂ et son témoin, le BH30(SucL)₃₂, utilisés dans la publication initiale qui me sert de référence (Tabarani *et al.* 2006).

A.



B.

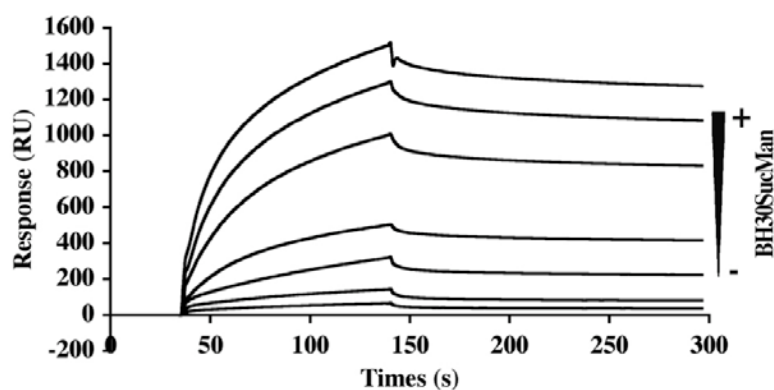
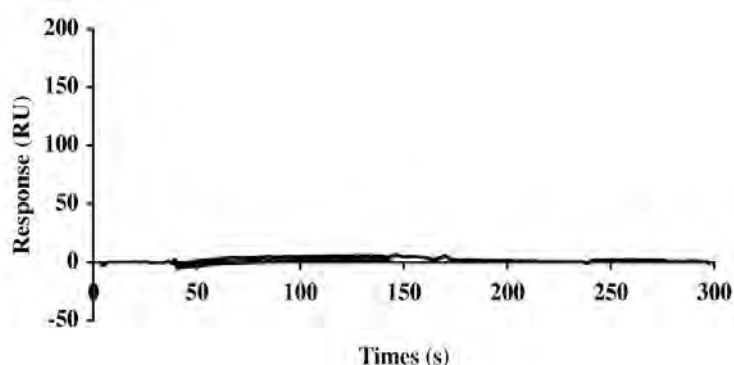


Figure.9: Présentation des profils de sensorgrammes obtenus suite à l'injection d'une gamme de concentrations identiques de BH30SucL et du BH30SucMan sur une piste DC-SIGN SEC orientée de haute densité, la piste DC-SIGN SEC HD. La gamme de concentrations de glycodendrimères utilisées est 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μ M.

Une gamme de concentrations de BH30(SucL)₃₂ a été injectée à un débit de 20 μ L/min au niveau des 4 pistes fonctionnalisées et de leurs 4 pistes témoins avec une injection de 20 μ L d'EDTA 50mM entre chaque injection. Le BH30(SucL)₃₂ est un dendrimère ne comportant pas d'unités sucrées reconnues par le CRD de DC-SIGN. Ainsi, aucune interaction ne devrait

être observée lors de son injection sur les pistes. Néanmoins, le traitement révèle qu'au niveau de la piste orientée DC-SIGN SEC, un gradient de réponse à faible échelle est observé mais qui disparaît totalement avant même l'injection de l'EDTA. Cela est typique d'une très faible interaction totalement réversible entre le BH30SucL et la piste orientée DC-SIGN SEC LD et HD (figure.9.A). Quant aux pistes non orientées DC-SIGN EC LD/HD, aucune réponse sur les sensorgrammes n'est observée (figure.10A).

A.



B

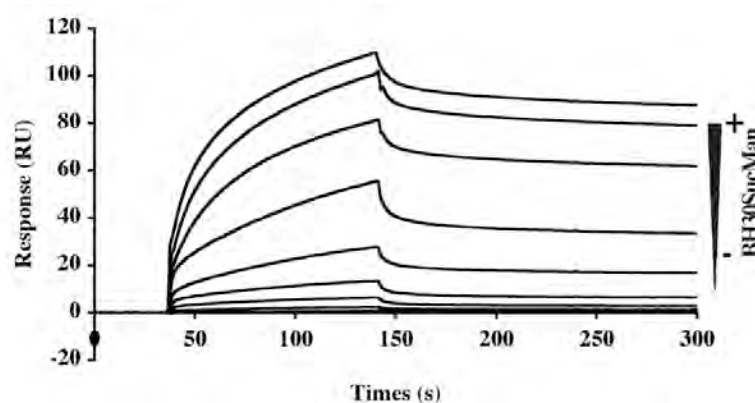
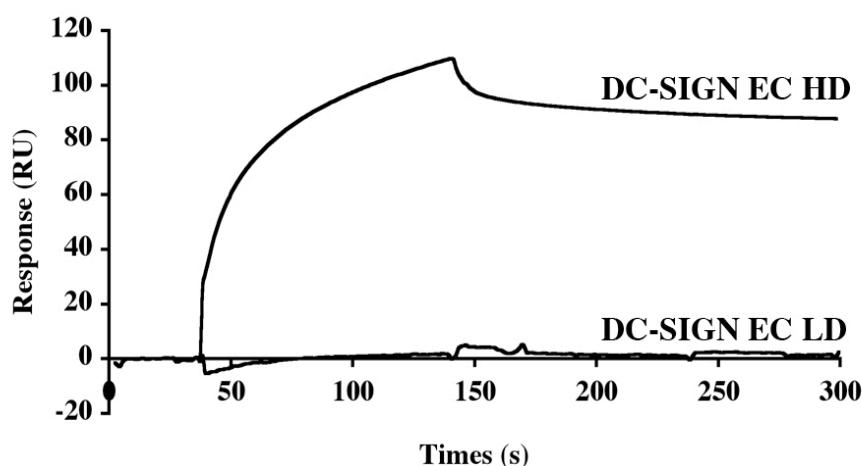


Figure.10: Présentation des profils de sensorgrammes obtenus suite à l'injection d'une gamme de concentrations identiques de BH30SucL et du BH30SucMan sur une piste DC-SIGN EC non orientée de haute densité, la piste DC-SIGN EC HD. La gamme de concentration de glycodendrimères utilisées est 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μM .

Une différence marquante est observée quand il y a injection de 70 μL de BH30(SucMan)₃₂ à 128 μM sur les 8 pistes. Le BH30SucMan comporte le squelette de BH30(SucL)₃₂ associé à 32 unités mannose reconnues par le CRD de DC-SIGN. Les résultats démontrent que les pistes DC-SIGN SEC LD réalisent une interaction avec la molécule alors que la piste non orientée DC-SIGN EC LD ne présente aucune réponse sur le sensorgramme obtenu (figure.11).

A.



B.

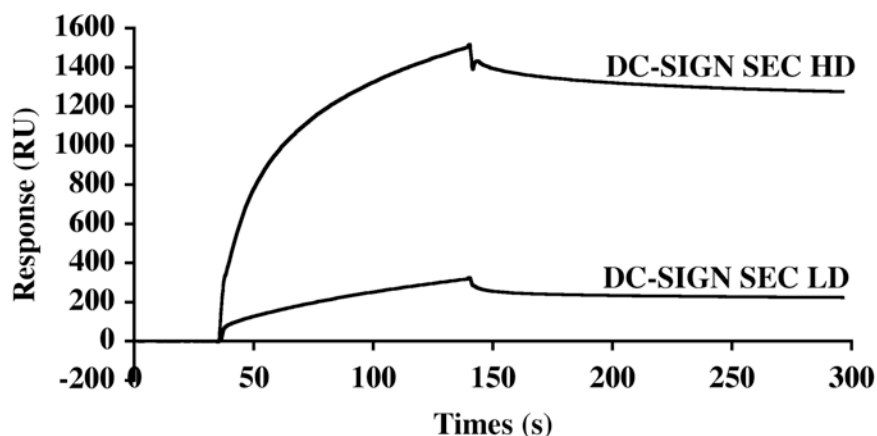


Figure.11: Sensorgrammes présentant la différence de reconnaissance qui existe entre les pistes orientées et non orientées de DC-SIGN de haute et basse densité vis-à-vis de BH30SucMan. HD représente la piste DC-SIGN de haute densité (4600-4800RU), LD représente la piste de DC-SIGN de basse densité (750-800RU). Tous les sensorgrammes représentés sont les résultantes de la soustraction des sensorgrammes BH30SucMan et BH30SucL obtenues pour la piste fonctionnalisée, le tout soustrait de la réponse obtenue sur la piste témoin

Cependant, la piste non orientée et orientée de haute densité, DC-SIGN EC HD et DC-SIGN SEC HD, interagissent avec la molécule mais avec une intensité de réponse différente. En effet, la piste DC-SIGN SEC dispose une interaction 13 fois supérieure à celle qui est observée sur une piste non orientée de même densité, DC-SIGN EC HD (figure.9.B, figure 10.B, figure11).

Nos nouvelles pistes orientées présentent donc une efficacité très supérieure à celles qui sont utilisées initialement. Cet effet est probablement dû à deux phénomènes :

- Premièrement, la perturbation de l'état oligomérique de la protéine lors de son immobilisation première sur les pistes non orientées (voir matériels et méthodes). En effet, sur la piste non orientée, la lectine DC-SIGN est fixée en condition acide ce qui conduit à un mélange monomère/tétramère alors que sur la piste orientée, DC-SIGN est fixée à l'état tétramérique.

- Deuxièmement, un certain nombre de récepteurs peuvent avoir leurs sites masqués par un pontage non favorable (voir figure.8 (A), piste2).

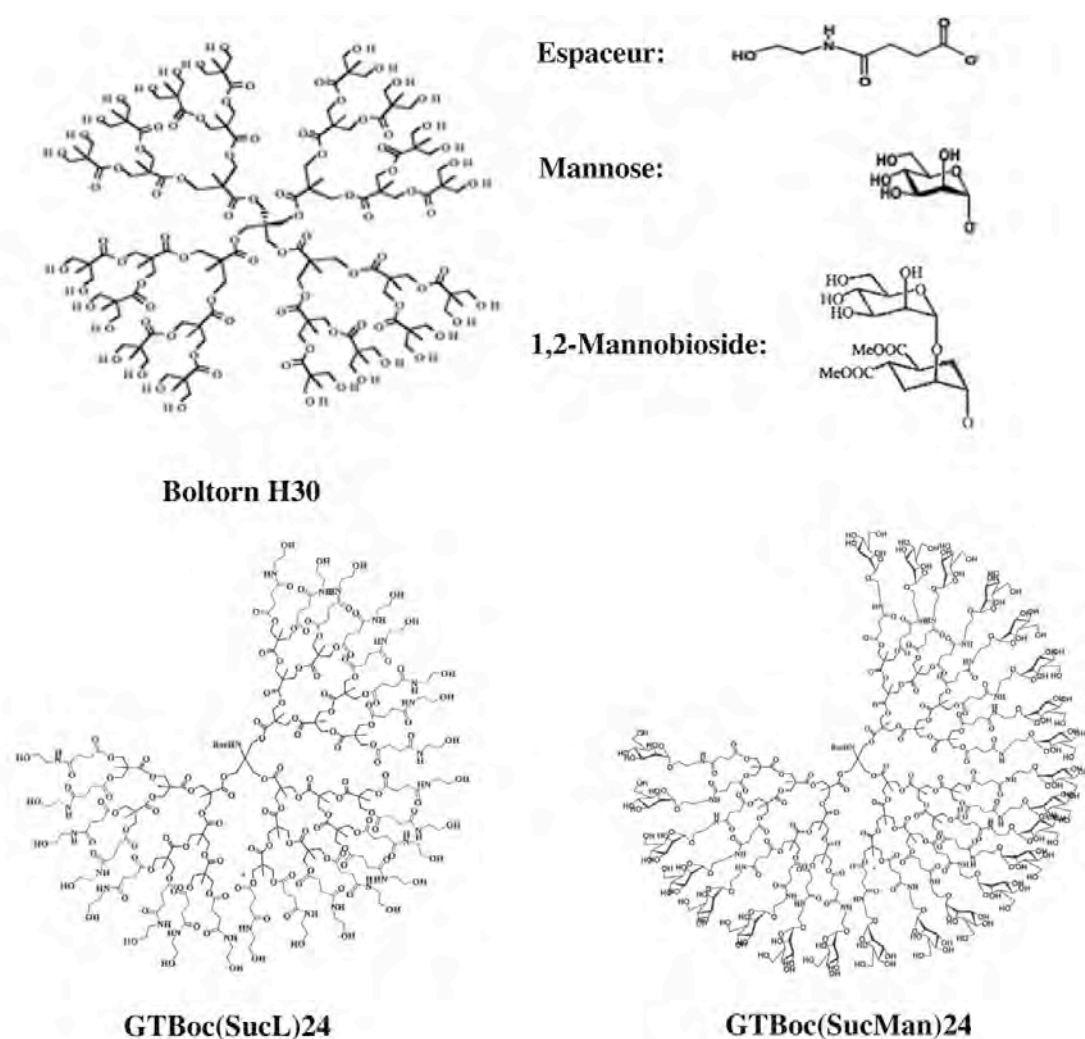


Figure.12: Les différentes molécules testées : le squeletteBH30, l'espaceur toujours directement associé au OH du BH30, les résidus qui peuvent s'associer à cet espaceur : le mannose et le 1,2-Mannobioside pour composer respectivement le BH30(SucMan)₃₂ et le G3(mimic1,2)₂₆, les 2 molécules composées de 3/4 de sphère représentées sont les GTBoc(SucL)₂₄ et le GTBoc(SucMan)₂₄.

Ces observations permettent également de valider le travail réalisé sur l'aspect biochimique de DC-SIGN (Résultats-Chapitre3).

4.8. Comparaison entre la présentation du ligand à DC-SIGN EC en solution ou sur une piste orientée:

Le test d'inhibition met en valeur la capacité du ligand multivalent à interagir avec la protéine cible, en l'occurrence DC-SIGN, en absence d'une contrainte géométrique de présentation du ligand pour la protéine. En effet, la protéine et les inhibiteurs multivalents sont en solution et donc la protéine aura accès à la sphère complète de l'inhibiteur multivalent (figure.13). Par contre, lors des études d'interaction de DC-SIGN avec le ligand multivalent, la protéine est fixée sur une piste, et seule une surface limitée du glycodendrimère interagira avec la protéine.

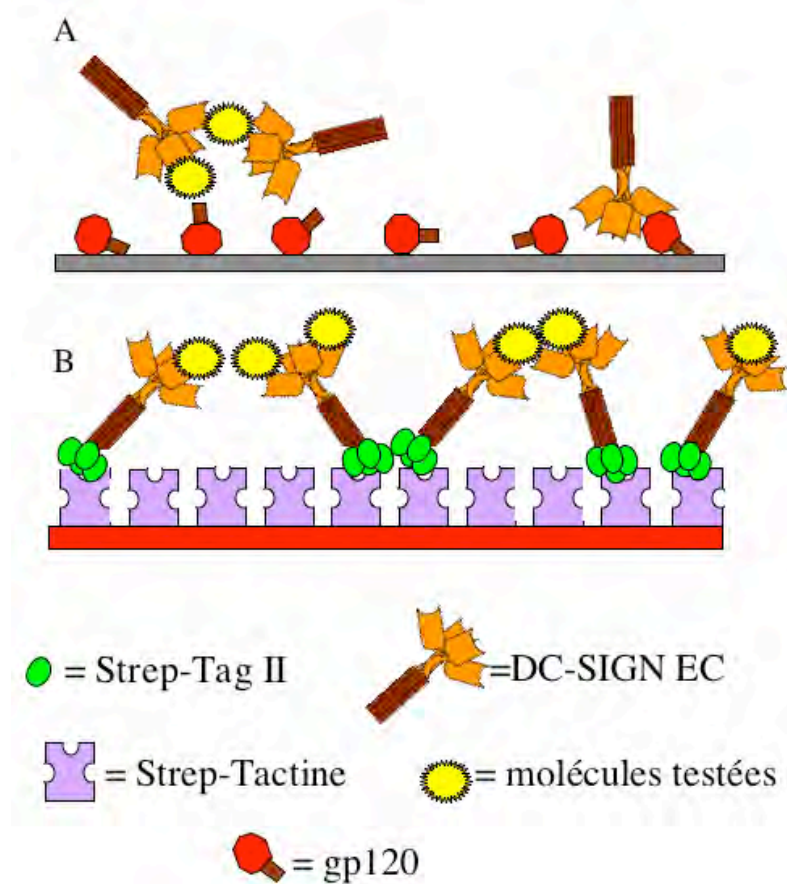


Figure.13: Schémas présentant (A) les études d'inhibitions de l'interaction de DC-SIGN avec une piste gp12 en présence des molécules ligands et (B) les études d'interactions d'un ligand avec une piste orientée de DC-SIGN SEC.

Dans cette étude, qui s'intéresse à l'importance de la présentation de ligands, nous avons obtenu des collaborateurs 5 ligands multivalents fonctionnalisés ou non (figure.12):

- Le BH30(SucMan)₃₂, notre premier inhibiteur multivalent et entièrement fonctionnalisé (32 unités mannoses/dendrimère) servira de référence dans cette étude et son témoin le BH30SucL.

- Le deuxième inhibiteur multivalent testé ne dispose que de 26 moles de 1,2 mannobioside/dendrimères sur les 32 OH disponibles sur la squelette Boltorn de troisième génération. Cela est dû à la difficulté de la synthèse des inhibiteurs multivalents. La molécule multivalente est appelée G3(mimic1,2)₂₆ et son témoin est le G3(SucL)₂₆.

- Une autre molécule testée possède d'un squelette de dendrimère ayant un quart de sphère en moins que la structure dendrimérique de BH30. Ce type de squelette est appelé GT. Ce squelette a un degré de pureté de 100% contrairement au BH30 utilisé, qui lui, est pure à 76%. Ce 3/4 de sphère est totalement fonctionnalisé par du mannose et possède une molécule BOC à la place du 1/4 manquant. Il est appelé GTBoc(SucMan)₂₄. Son témoin serait alors la GTBoc (SucL)₂₄. Cette molécule BOC est un groupe tertio-butyl carbamate qui agit comme un groupe protecteur labile et ainsi pourra être remplacé par d'autres molécules (Green et *al.* 1999): des groupes fluorophores ou un espaceur aminé utilisable dans la réalisation des pistes orientées. Ce remplacement de BOC par d'autres molécules est réalisable sans crainte pour l'intégrité chimique du glycodendrimère.

Les études ont démarré en réalisant un test d'inhibition de DC-SIGN EC avec la piste gp120 en présence d'une gamme de concentrations de chaque inhibiteur : 182, 156, 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μ M. Ainsi, une gamme de concentrations identiques de BH30(SucMan)₃₂, GTBoc(SucMan)₂₄ et de G3(mimic1,2)₂₆ et leurs témoins respectifs, le BH30(SucL)₃₂, GTBoc(SucL)₂₄ et le G3(SucL)₂₆, est injecté en présence d'une concentration saturante de DC-SIGN EC constante sur piste gp120 possédant un RUg de 356RU (figure.14). Le volume d'injection est de 70 μ L et le débit de 20 μ L/min. Les études démontrent :

- L'absence d'interaction entre les molécules témoins et DC-SIGN.
- Le G3(mimic1,2)₂₆ possède d'une IC₅₀ 6 fois plus petit que le BH30(SucMan)₃₂. Ainsi, la molécule mimics interagit six fois mieux avec DC-SIGN (IC₅₀ du mimic=20 μ M, du BH30(SucMan)₃₂=130 μ M).
- Le GTBoc(SucMan)₂₄ possède d'une IC₅₀ 0,15 fois inférieure à celle de BH30(SucMan)₃₂. Ceci est en corrélation avec la structure de GTBoc(SucMan)₂₄ qui manque de 1/4 de sphère (GTBoc(SucMan)₂₄=175 μ M).

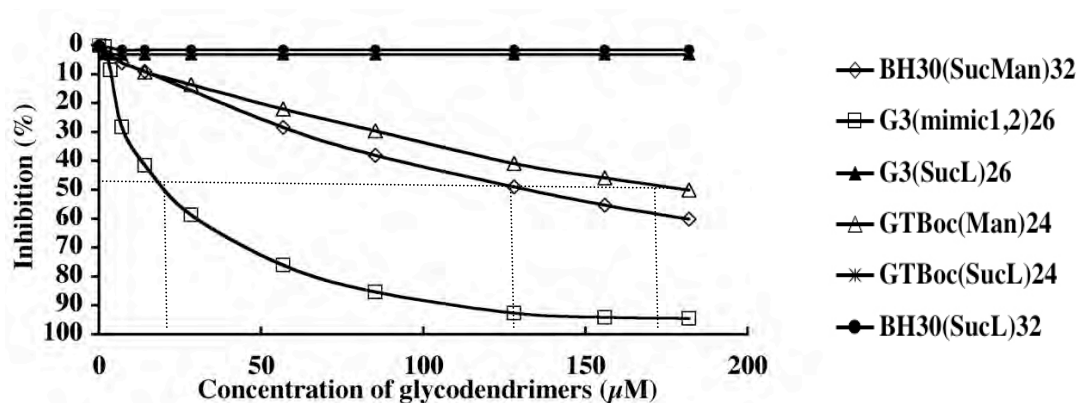


Figure.14: Courbe d'inhibition de DC-SIGN EC par les glycodendrimères et de leurs témoins sur une piste gp120 ayant un Rug de 356. La gamme de concentration choisie est : 182, 156, 128, 85.2, 56.8, 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μM . En pointillé sont représentées les valeurs des IC_{50} des courbes : IC_{50} du mimic=20 μM , du BH30(SucMan)₃₂=130 μM et GTBoc(SucMan)₂₄=175 μM .

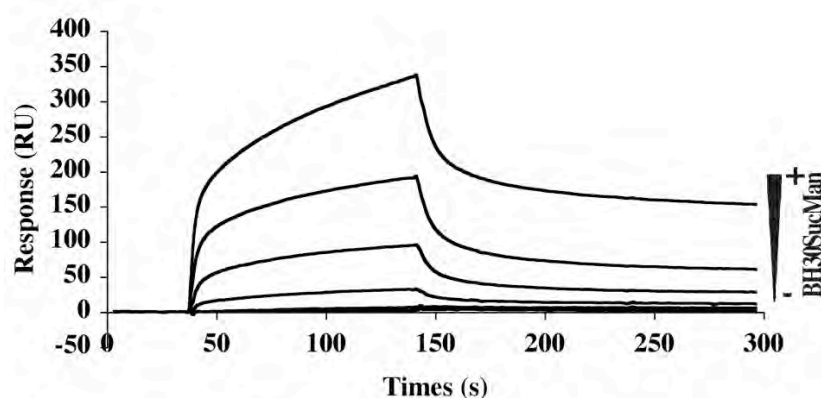
Après avoir analysé la capacité inhibitrice des différents inhibiteurs multivalents en solution, des tests d'interactions sont effectués avec des pistes orientées de DC-SIGN SEC de densité moyenne (RUG de 2500RU). Une gamme identique de ces 6 molécules à un volume de 45 μL est injectée dans le tampon de course à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. La gamme de concentration étant définie comme tel : 14.2, 7.1, 3.55, 1.78, 0.89 et 0.45 μM (figure.15).

Les résultats démontrent que:

- Le GTBoc (Man)₂₄ et son témoin interagissent de façon irréversible avec la piste orientée DC-SIGN SEC (données non représentées). Il se peut que le groupe Boc soit à l'origine de cette irréversibilité de l'interaction.

- Le BH30Suc(Man)₃₂ réalise une interaction avec la piste orientée DC-SIGN SEC 1,5 fois meilleure que le G3(mimic1,2)₂₆ (figure.14). Ainsi, un dendrimère complètement fonctionnalisé par un sucre simple, le BH30(SucMan)₃₂, est plus efficace qu'un dendrimère incomplètement fonctionnalisé par un pseudo-disaccharide, même si ce dernier possède une capacité de reconnaissance 6 fois supérieure au mannose lors des études d'inhibition réalisées en solution. En effet, cela permet de démontrer l'importance de la concentration locale et de la géométrie de présentation du ligand monovalent par le dendrimère dans le cas d'une piste fixant la lectine DC-SIGN SEC d'une façon orientée.

A-



B-

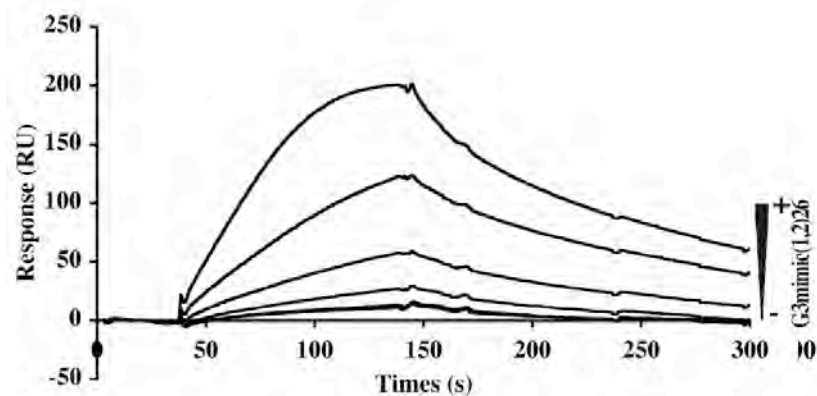


Figure.15: Sensorgramme représentant l'interaction de BH30(SucMan)₃₂ (A) et G3mimic(1,2)₂₆ (B) avec la piste orientée DC-SIGN SEC densité moyenne (Rug=2500RU). La gamme de concentration de glycodendrimère utilisée est de 14.2, 7.1, 3.55, 1.78 ; 0.89 et 0.45 μM.

Le contraste observé dans les deux situations, de facteur 6 en solution et de similarité du niveau d'interaction sur une piste orientée, est au premier abord assez surprenants. La différence majeure étant l'absence du degré de liberté du récepteur, on peut proposer comme suggestion que la concentration locale ainsi que la géométrie de présentation du ligand par le dendrimère jouent un rôle plus important dans ce type de mesure avec des surfaces orientées. En effet, même si le disaccharide monovalent dispose une meilleure affinité pour le site CRD que le mannose, ceci est compensé, dans cette exemple, par du glycodendrimères mannose (32 vs 26). Le G3(mimic1,2)₂₆ partiellement fonctionnalisé sur ces espaceurs présentant des trous ou des positions vacantes du ligand. Une meilleure compréhension de ce phénomène devra être fait avec du G3(mimic1,2)₂₆ complètement fonctionnalisé (32 ligands sur la couronne extérieurs).

RESULTATS
CHAPITRE 5 : Essai Cristallogénèse

CHAPITRE 5 : Essai Cristallogénèse

1. Essais de cristallogénèses de DC-SIGN Neck:

Des essais de cristallogénèse sur la construction protéique DC-SIGN Neck, dépourvue de son Strep-Tag II, ont été initiés avec le robot cartésien de l'EMBL à Grenoble (<http://www.embl.fr/groups/htt/crystallisation.html>).

Les screens suivants ont été testés :

Screen Hampton research

- Crystal Screen I & II
- Crystal Screen Lite & PEG/Ion
- MembFac & Natrix
- QuickScreen
- Grid screens Ammonium Sulfate
- Grid screens Sodium Malonate –
- Sodium Formate (screen maison)
- Grid screens PEG 6K, PEG/LiCl, MPD
- Screen MME (screen maison)
- Index Screen

Screen Qiagen/Nextal

- The PACT
- The JCSG

Des petits objets d'aspect cristallins ont été observé dans la condition 6 du screen hampton "Grid Screens MPD" correspondant à la composition suivante : 20 % MPD, 0.1M Bicine pH 9. Il est à noter qu'à ce pH, comme démontre les expériences d'ultracentrifugation analytique, l'intégrité du tétramère est bien conservée. En améliorant les conditions de cristallisation de ce puit, des petits cristaux multistrates en formes d'oursin sont obtenus. En effet, ces cristaux poussent par diffusion de vapeur en goutte suspendue après 1 jour à 20°C et cela après avoir mélangé 1µL de solution protéique à 7 mg/ml avec 1µL de solution mère contenant 0,15 M d'acétate de magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 8% glycérol, 0,1 M Bicine pH 9 (figure.1).

Ainsi, nous avons réalisé un criblage où seul la concentration en acétate de magnésium variait entre 0,05 et 0,8 M. Nous observons que plus la concentration d'acétate de Magnésium est importante, plus les cristaux avaient du mal à se former. Ensuite nous avons fixé la concentration en acétate de magnésium à 0,15M et on a varié la concentration en acétate d'ammonium entre 0,2 et 0,8 M. Nous avons observé une augmentation du phénomène de précipitation et de nucléation proportionnel à la quantité d'acétate d'ammonium présente. Or comme la formation des points de nucléation se fait en quantité importante au niveau de la solution, on a essayé de retarder leur apparition en diminuant la concentration en protéine. Ainsi nous avons essayé avec 3 concentrations différentes de protéines (4, 5 et 6 mg/ml). Aucune diminution de la vitesse du phénomène de nucléation n'a été observée. La deuxième option était d'augmenter la viscosité au niveau la solution mère, ainsi nous avons réalisé une gamme de concentration de glycérol allant de 8 à 80% ou de Bicine allant de 0,1 à 0,5M. l'application du glycérol ou du Bicine à une forte concentration ralentir la formation des centres de nucléation mais pas leurs nombres, de plus les cristaux ne semblaient pas avoir gagné en qualité (des cristaux multistrates).

Comme la construction Neck ne se précipite pas à une basse température (4 et 8°C), on a réalisé des essais de cristallogénèse en présence d'une solution-mère contenant 0,15 M d'acétate de magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 8% glycérol, 0,1 M Bicine pH 9. Le temps de l'apparition des noyaux de nucléation était retardé mais pas leurs nombres.

Ensuite, en utilisant un screen additif et de détergent (Kit Hampton), nous n'avons pas pu améliorer la qualité ou la taille des cristaux. Ainsi ce travail a dû s'arrêter à ce stade.

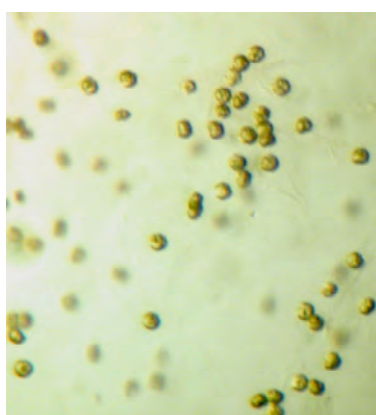


Figure.1 : Cristaux de DC-SIGN Neck en présence de 0,15M d'acétate Magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 8% glycérol, 0,1M Bicine pH 9.

2. Essais de cristallogenèse de DC-SIGN SNeck:

Comme pour la construction DC-SIGN Neck, des essais de cristallogenèse de la construction DC-SIGN SNeck disposant toujours de son étiquette Streptag II, ont été initiés avec le robot cartésien de l'EMBL à Grenoble. La majorité des conditions en Bicine ou Tris-HCl à pH basique ont abouti à des cristaux en formes d'épines, de carré ou en formes d'oursin.

Au final, la condition qui donne les meilleurs résultats avec cette version taggée de la protéine est proche (au glycérol près) de la condition défini pour le Neck dans la Figure 1. Dans cette condition, on obtient des cristaux carrés multistrates avec un taux de nucléation très important. Ces cristaux poussent par diffusion de vapeur en goutte suspendue après 1 jour à 20°C et cela après avoir mélangé 1µL de solution protéique à 18 mg/ml avec 1µL de solution mère contenant 0,15M d'acétate Magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 0,1M Tris-HCl pH 8,9 (figure.2).

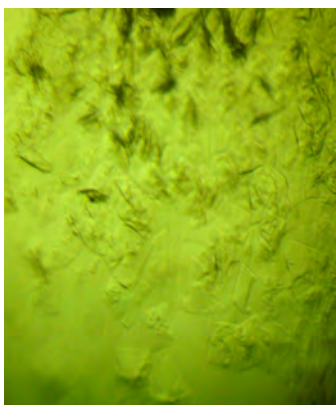


Figure.2: Cristaux de DC-SIGN SNeck en présence de 0,15M d'acétate Magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 0,1M Tris-HCl pH 8,9.

Ainsi, nous avons tenter de réduire le nombre de centre de nucléation en diminuant la quantité en protéine présente (4, 7, 10, 12 et 15 mg/ml) sans succès. Ainsi, j'ai procédé à une augmentant de la concentration en Tris-HCl pH 9 et de la viscosité (ajout de glycérol), une diminution du taux de nucléation a pu être obtenue. La condition qui a permis d'obtenir les cristaux carré monostrates comporte 1µL de la protéine concentrée à 18 mg/ml mélangé à 1µL de solution mère : 0,3 M d'acétate d'ammonium, 0,15 M d'acétate de Magnésium, 0,3 M Tris-HCl pH 8,9, 8%Glycérol (figure.3).



Figure.3 : Cristaux de DC-SIGN SNeck en présence de 0,15M d'acétate Magnésium, 0,3M d'acétate d'ammonium, 8% glycérol, 0,3M Tris-HCl pH 8,9.

Même si certains de ces cristaux sont à 100 μm de taille avec une épaisseur de 7 à 10 μm , ils ont pu être pêché puis congelé dans de l'azote liquide en présence d'un mélange cryoprotecteur qui comporte 0,3 M d'acétate d'ammonium, 0,15 M d'acétate de Magnésium, 0,3M tampon Tris-HCl pH 8 et 30% glycérol. Le spectre de diffraction aux Rayons X réalisé sur le cristal de DC-SIGN SNeck à l'ESRF ligne ID23 (microfocus), a permis d'acquérir les informations suivantes (figure.4):

- Les taches de diffraction obtenu confirme qu'il s'agit bien d'un cristal de protéine.
- La résolution est de 8 Å et est top faible à ce stade pour permettre d'envisager la résolution de la structure.
- Les taches de diffraction obtenues suite à la diffraction du cristal aux Rayons X sont très larges et cela peut être dû à une cristallisation inhomogène ou à une mauvaise condition de cryoprotection.

Ces premiers essais cristallographiques ont été réalisés avec l'aide d'Aurélien Deniaud et d'Eva Pebay-Peroula.

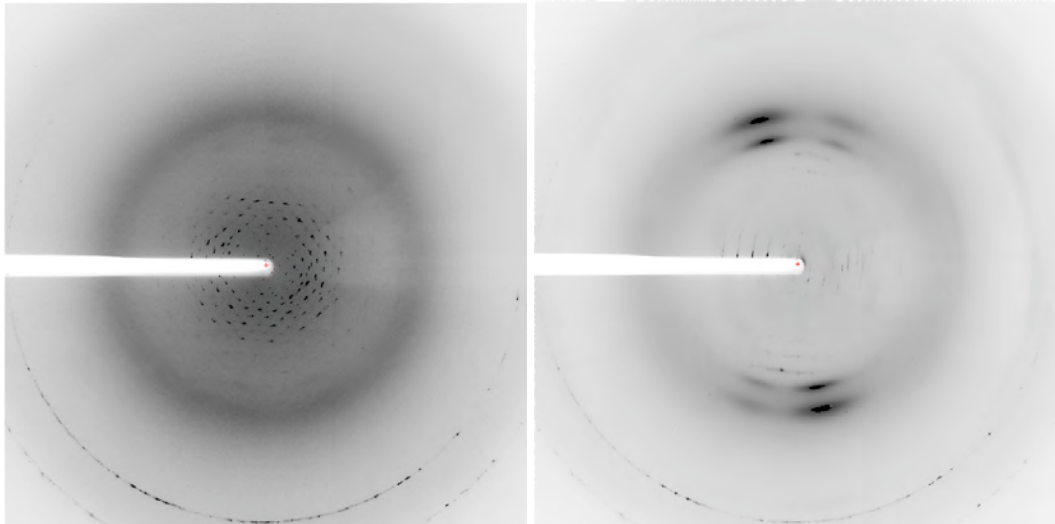


Figure.4 : Clichés de diffraction des Rayons X pour un cristal de DC-SIGN SNeck : à gauche, les Rayons X sont envoyés perpendiculaire à la face plane du cristal et à droite, les Rayon X sont envoyés parallèlement à la face plane du cristal.

Sur la base de ces premières conditions de cristallisation, un effort supplémentaire sera poursuivi à l'issue de cette thèse, pour améliorer ces cristaux et aller vers la résolution de cette structure.

Conclusion

Conclusion

DC-SIGN est une lectine impliquée dans la reconnaissance de nombreux pathogènes viraux et non viraux. Le fait que DC-SIGN soit utilisé par de nombreux pathogènes pour détourner les défenses du système immunitaire fait de cette lectine une cible thérapeutique importante mais surtout un modèle biologique intéressant pour la validation d'un nouveau concept d'inhibiteur. En effet, ce sujet ambitieux et jeune ne vise pas le développement d'une molécule thérapeutique, à l'échelle du temps d'une thèse, mais plutôt à analyser et développer un nouveau concept -modèle d'inhibiteurs qui n'ont cessé d'évoluer au cours de ma thèse.

Pourquoi avoir choisi DC-SIGN comme modèle d'étude biologique ?

Au départ, DC-SIGN est une lectine membranaire organisée en microdomaine à la surface des cellules dendritiques et donc facilement accessible pour les inhibiteurs sur un test d'infection cellulaire par un virus de choix. En effet, comme la cible n'est pas dans le milieu intracellulaire, la stratégie de développement est simplifiée puisqu'elle n'est pas obligée de prendre en compte la complexité de la traversée de la membrane cellulaire.

Deuxièmement, le laboratoire possédait les outils protéiques nécessaires pour réaliser les études d'interaction entre DC-SIGN et les inhibiteurs élaborés : une construction protéique tétramérique exprimant le domaine extracellulaire entier de DC-SIGN, une construction protéique monomérique n'exprimant pas le domaine de reconnaissance de sucres de DC-SIGN et l'accès à la méthodologie SPR permettant d'envisager la fonctionnalisation de surfaces de DC-SIGN et d'espérer à terme de mimer leur organisation en microdomaines au niveau de la surface cellulaire.

A cela s'ajoute une structure du domaine de reconnaissance de sucre de DC-SIGN résolue en présence de nombreux ligands et publié par Feinberg (Feinberg et *al.* 2001). Cette structure est importante pour la modélisation des structures osidiques modifiées imitant les modèles naturels de sucres.

Les stratégies de travail utilisées pour le développement d'inhibiteurs :

Dans le cadre de ma thèse, et dans le contexte d'un réseau de collaboration avec des chimistes, nous avons opté pour une stratégie de développement d'inhibiteurs capables de mimer le modèle d'interaction multivalente virale avec les microdomaines de DC-SIGN. Ainsi, la première étape était le choix d'un squelette de base pour ces molécules multivalentes.

Nos collaborateurs chimistes nous ont proposé deux générations différentes d'un dendrimère hyperbranché appelé Boltorn. Ainsi, nous avons démarré les études avec un Boltorn de deuxième et de troisième génération lié à une unité mannose par son carbone anomérique, le C1. L'interaction multivalente de ces glycodendrimères et plus particulièrement de la troisième génération, le BH30SucMan a été validée par une double approche, SPR et ultracentrifugation analytique. La deuxième étape consistait alors à améliorer le ligand qui fonctionnalise le dendrimère. Cela s'est fait sur trois axes :

1^{er} axe : Modification du site d'accrochage du mannose au dendrimère puisque des études par modélisation ont démontré l'intérêt potentiel de modifications au niveau du C1 pour augmenter son affinité pour le CRD de DC-SIGN. En effet, l'ajout de groupements hydrophobes en C1 serait capable de réaliser une interaction avec une phénylalanine située au niveau de la surface du CRD. Les analyses ont démontré que les molécules ayant un espaceur liant le mannose par le C1 et l'autre par le C6 sont capables d'être fixées avec une affinité comparable par le CRD de DC-SIGN. Ceci ouvre la voie à de telles modifications sur le C1 pour des glycodendrimères.

2^{ème} axe : Réalisation d'une structure disaccharidique modifiée mimant le Man(1,2)Man. Cette molécule est un ligand stable chimiquement, hydrosoluble et résistant à l'hydrolyse enzymatique. Plusieurs contrôles ont été réalisés sur cette molécule qui utilise un mannose modifié afin de la valider comme un outil adéquat à l'inhibition de la lectine. Ce type de molécule est appelé « mimic ». Ensuite, un dendrimère de la 3^{ème} génération a été partiellement fonctionnalisé avec le disaccharide « mimic » afin d'obtenir le premier inhibiteur multivalent à base de sucre modifié. Cette molécule a fait preuve d'une plus grande capacité inhibitrice que celle du BH30sucMan.

3^{ème} axe : Après avoir validé le concept d'un glycomimic (sucre modifié) à deux unités pseudo-sucrées, nos collaborateurs ont développé des glycomimics à trois unités et mimant le Lewis-X naturel, le pseudo-Lewis-X. Ce dernier s'est avéré plus performant que son modèle naturel dans l'inhibition de l'interaction de DC-SIGN avec les unités sucrées

Dans l'avenir, nous prévoyons la réalisation et la caractérisation biochimique de l'interaction de DC-SIGN avec des dendrimères de 3^{ème} génération fonctionnalisés par le pseudo-Lewis-X ou par des molécules de mannose liées à un groupe hydrophobe en C1.

La caractérisation structurale de DC-SIGN:

Afin de réaliser des molécules inhibitrices sur des bases plus logiques que le criblage chimique, nous nous sommes investi dans des études structurales qui prennent en compte l'état oligomérique de la lectine. En effet, une information sur les orientations ainsi que la distance entre chaque tête CRD au niveau du tétramère de DC-SIGN serait très utile pour le développement de molécules chimiques capables d'interagir, avec une plus grande spécificité, avec le tétramère plutôt qu'avec un microdomaine de DC-SIGN. Comme le domaine extracellulaire de DC-SIGN est très dur à cristalliser, nous avons procédé à la reconstitution de son enveloppe par technique SAXS. Le remplacement moléculaire des têtes CRD au sein de l'enveloppe permet de dire, bien qu'avec une certaine imprécision, que les têtes CRDs sont plutôt regroupées comme une corolle fermée. Ces informations n'ont pas encore le caractère de précision permettant un affinement des molécules multivalentes adaptées à la présentation des têtes CRDs, mais constitue le premier pas dans la caractérisation structurale de la forme tétramérique fonctionnel.

Pourquoi avoir choisit de travailler sur la région Neck de DC-SIGN ?

Nous savons que la région Neck permet d'orienter les têtes CRDs et joue également un rôle important dans la tétramérisation. Afin d'augmenter la précision au sein du modèle SAXS réalisé, nous nous sommes investi dans l'élaboration d'une construction protéique n'exprimant que la région Neck pour ensuite effectuer avec des essais cristallographiques. Les essais cristallographiques sur la région Neck m'ont permis d'obtenir un cristal diffractant jusqu'à une résolution de 8 Å.

Comme DC-SIGN est internalisé dans des endosomes où règne un pH acide, l'intégrité structurale de la région Neck pourrait être affectée et influencera ainsi le phénomène d'avidité observé lors de l'interaction du DC-SIGN avec un pathogène. Ainsi, une analyse biochimique de l'effet du pH sur le CRD, la région Neck et le domaine extracellulaire entier comportant les deux précédentes régions citées ont été analysées. Ces études de pH ont mis en évidence conjointement une altération de l'intégrité structurale de la région Neck de DC-SIGN influençant ainsi l'état oligomérique de la protéine et la structure du CRD lui-même. Ces deux éléments affectent donc potentiellement la reconnaissance multivalente des pathogènes. Suite à cela, nous avons proposé un modèle cellulaire où un pathogène pourrait être relâché dans l'endosome intermédiaire où règne un pH avoisinant 5.9 sachant que ce travail s'oriente dans le sens des découvertes réalisées par Gramberg et ses collaborateurs à l'issue d'une étude *in vivo* (Gramberg et al. 2008).

De plus, cette étude a permis également de proposer un modèle d'assemblage monomère en tétramère résistant à l'effet du sel, suggérant un modèle d'interaction tétramérique de type coiled-coil organisé autour d'un cœur hydrophobe.

La mise au point de plusieurs pistes pour les expériences par technologies SPR (BIAcore):

Lors de mon travail de thèse, les surfaces protéiques et glycoconjuguées n'ont cessé d'évoluer.

- Pour les pistes présentant des glycoconjugués: nous avons démarré les études avec des pistes fonctionnalisées avec des glycoprotéines par pontage covalent. En effet, pour les analyses de l'interaction de DC-SIGN avec un sucre, nous avons utilisé des pistes gp120 qui ont été immobilisées grâce à leur partie protéique sur les pistes (comme décrit dans Halari et *al.* 2002). Or, comme le gp120 est dur à obtenir, nous avons effectué la suite des études avec des pistes BSA-(Man α 1,3(Man α 1,6)Man)₁₅ ayant fait preuve de leur efficacité à lier DC-SIGN et disponibles dans la commerce. Dans les deux cas cités, les pistes osidiques ne sont pas orientées. Pour affiner les mesures réalisées, nous avons pu obtenir une piste orientée où le sucre est lié à la surface BIAcore par un espaceur possédant un seul groupe amine terminal.

- Pour les surfaces protéiques : Lorsque nous avons démarré ce travail, l'utilisation de la technologie SPR BIAcore pour mesurer les interactions entre DC-SIGN et ses ligands avaient déjà été rapportée dans un certain nombre de publications. Parmi celle-ci des différences d'interaction entre des surfaces DC-SIGN CRD et ECD avaient été constatées et attribuées au phénomène d'avidité dépendant de la tétramérisation de DC-SIGN ECD (Frison et *al.* 2003, Lozac et *al.* 2003, Snyder et *al.* 2005). Ainsi, sur la base de ces premiers exemples de surfaces fonctionnelles, nous avons réalisé notre première étude de validation du concept d'inhibiteurs multivalent en réalisant des surfaces DC-SIGN par immobilisation covalente, nécessitant un tampon de couplage acide du fait du PI de la protéine (Tabarani et *al.* 2006). Nous avons également obtenu des surfaces fonctionnelles avec des différences de propriétés d'interaction semblant en adéquation avec des types de protéines EC ou CRD. Or, lors de notre étude biochimique du récepteur, nous avons démontré qu'un pH acide avait un effet déstabilisant sur l'état oligomérique de DC-SIGN. Ainsi, les pistes non orientées que l'on croyait fixer des tétramères de DC-SIGN, en réalité, fixaient un mélange hétérogène de monomères-tétramères de cette protéine. Suite à ce travail, il s'est avéré nécessaire de faire évoluer les pistes DC-SIGN en développant des pistes orientées. Ces pistes ont été mises au point en réalisant une nouvelle construction de DC-SIGN EC étiquetée au Strep-tag II puis en ayant recours à

l'interaction Strep-Tactine/Strep-tag II. L'avantage est que la phase de capture du DC-SIGN étiqueté au Strep-Tag II par la piste Strep-Tactine peut se faire dans un tampon adapté au maintien de la stabilité oligomérique de la lectine. Mon travail de thèse se termine donc sur la production de ce nouvel outil pour de futures études d'interaction entre DC-SIGN et ces ligands.

Bilan et perspectives de ce travail:

Cette thèse, la première réalisée sur ce sujet au laboratoire, a permis de mettre au point les outils protéiques, les pistes orientées sucrées ou protéiques et de valider le concept d'inhibiteur multivalent modifié. Actuellement, le défi s'oriente à la réalisation d'une molécule multivalente complètement fonctionnalisée par le pseudo-Lewis X ou des mannoses associés en C1 à un groupe hydrophobe. Si elle démontrait une haute affinité pour DC-SIGN, il serait ainsi intéressant d'améliorer ensuite la spécificité de cette molécule vis-à-vis d'autres familles de lectines de type C. En effet, notre équipe travaille également sur une lectine qui contrairement à DC-SIGN s'oppose à la dissémination du VIH dans le corps humain, il s'agit de la Langerine (De Witte et *al.* 2007). Par conséquent, il serait intéressant de développer des molécules multivalentes capables de se fixer spécifiquement au niveau du CRD de DC-SIGN sans avoir d'affinité pour la Langerine.

Concernant les glycodendrimères, il serait important d'envisager, à court terme, des tests de leur facteur immunogène et de leur biodisponibilité chez des souris.

À long terme, et même si le travail a démarré sur l'exemple d'infection au VIH, ces molécules pourraient s'avérer plus utiles dans d'autres pathologies associées à DC-SIGN comme l'infection par le virus de la dengue qui vise plus directement les cellules dendritiques (Navarro-Sanchez et *al.* 2003). En effet, dans le cas du VIH, l'interaction DC-SIGN-virus a un rôle important dans les phases initiales de l'infection. Une fois les LTs infectés, l'inhibition de DC-SIGN ne revêt plus le même intérêt.

Bibliographie

Bibliographie

A

Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol* 2001;100(3):325-38.

Anjuere F, del Hoyo GM, Martin P, Ardavin C. Langerhans cells develop from a lymphoid-committed precursor. *Blood* 2000;96(5):1633-7.

Anostario M, Huang K-S. Modulation of E-selectin structure/function by metal ions, *J Biol Chem* 1995; 270:8138–8144.

Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993;362(6422):761-3.

Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguet V. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med*. 2004;200(10):1279-88.

B

Bashirova AA, Wu L, Cheng J. Novel member of the CD209 (DC-SIGN) gene family in primates. *J Virol*. 2003;77:217-227.

Banchereau J, Briere F, Caux C. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.

Brier S: Etude des interactions entre la kinésine mitotique humaine Eg5 et ses inhibiteurs. Thèse de Doctorat, 2005.

Bajorath J, Aruffo A. Molecular model of the extracellular lectin-like domain in CD69. *J Biol Chem* 1994; 269:32457–32463.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 2000;192(12):F39-44.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.

Barth, RF, Adams DM, Soloway AH, Alam F & Darby MV. Boronated starburst dendrimer-mono-clonal antibody immunoconjugates: Evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem*. 1994;5:58–66.

Baxevas AD, Vinson CR. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(2):278-85.

Bernardi A, Arosio D, Manzoni L, Micheli F, Pasquarello A, Seneci P. Stereoselective synthesis of conformationally constrained cyclohexanediols: a set of molecular scaffolds for the synthesis of glycomimetics. *J Org Chem*. 2001;66:619:6209-16.

Bezouska K, Nepovim A, Horvath O, Pospisil M, Hamann J, Feizi T. CD69 antigen of human lymphocytes is a calcium-dependent carbohydrate binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208:68–74.

Bezouska K, Yuen CT, O'Brien J, Childs RA, Chai W, Lawson AM, Drbal K, Fiserová A, Pospisil M, Feizi T. Oligosaccharide ligands for NCR-PI protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature* 1994; 372:150–157.

Bezouska K. et al. Rat natural killer cell antigen. NKR-PI, related to G-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269:16945–16952.

Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Johnson J, Tomalia DA & Baker JR. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:2176–2182.

Biessen EAL, et al. Lysine-based cluster mannosides that inhibit ligand binding to the human mannose receptor at nanomolar concentrations. *J Biol Chem* 1996; 271:28024–28030.

Blanck O, Iobst ST, Gabel C, Drickamer K. Introduction of selectin-like binding specificity into a homologous mannose-binding protein. *J Biol Chem* 1996; 271:7289–7292.

Bleijds DA, Geijtenbeek TB, Figdor CG. DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol.* 2001;22:457-463.

Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000;192(12):1785-96.

Bogoevska V, Horst A, Klampe B. CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiol.* 2006;16:197-209.

Borrok MJ, Kiessling LL. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;129:12780-12785

Bourne MW, Margerun L, Hylton N, Campion B, Lai JJ, Derugin N & Higgins CB. Evaluation of the effects of intravascular MR contrast media (gadolinium dendrimer) on 3D time of flight magnetic resonance angiography of the body. *J. Magn. Reson. Imaging* 1996; 6:305–310.

Boutonat J., Cours DCEM-1 2008, UJF-faculté de médecine.

Boyington JC, Riaz AN, Patamawenu A, Coligan JE, Brooks AG, and Sun PD. *Immunity* 1999;10:75–82

Brennan J, Takei E, Wong S, Mager DL. Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C. *J Biol Chem* 1995; 270:9691–9694.

Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997;155:53–65.

Bryant LH, Brechbiel MW, Wu C, Bulte JWM, Herynek V & Frank JA. Synthesis and relaxometry of high-generation (G=5, 7, 9, and 10) PAMAMdendrimer-DOTA-gadolinium chelates. *J. Magn. Reson. Imaging* 1999; 9:348–352.

Burleigh L, Lozach PY, Schiffer C, et al. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol.* 2006;80:2949-2957.

Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C, Abastado JP, Lifson JD, Arthur LO, Rivière Y, Heard JM, Schwartz O. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat Med.* 2001 Mar;7(3):344-9.

C

Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EM, de Bakker BI, Fransen JA, Bovee-Geurts PH, van Leeuwen FN, Van Hulst NF, Figdor CG. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol.* 2004;164(1):145-55.

Caminati G, Turro NJ & Tomalia DA. Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112:8515–8522.

Capala J, Barth RF, Bendayam M, Lauzon M, Adams DM, Soloway AH, Fenstermaker RA & Carlsson J. Boronated epidermal growth factor as a potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors. *Bioconjug. Chem.* 1996;7:7–15.

Caparros E, Munoz P, Sierra-Filardi E. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 2006;107:3950-3958.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 2002;73(1 Suppl):S7-11.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996;184(2):695-706.

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000;1(4):305-10.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5(8):919-23.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184(2):747-52.

Childs RA, Feizi T, Yuen C-T, Drickamer K, Quesenberry MS. Differential recognition of core and terminal portions of oligosaccharide ligands by carbohydrate-recognition domains of two mannose-binding proteins. *J Biol Chem* 1990; 265:20770–20777.

Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34(3):796-805.

Cohen C, Parry DA. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins*. 1990;7(1):1-15.

Cooke RM, Hale RS, Lister SG, Shah G, Weir MP. The conformation of the sialyl Lewis X ligand changes upon binding to E-selectin, *Biochemistry* 1994; 33:10591–10596.

Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E. Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells. *J Immunol* 1999;163(11):5920-8.

Crouch E., McDonald, B., Smith, K., Roberts, M., Mealy, T., Seaton, B., Head, J. Critical Role of Arg/Lys343 in the Species-Dependent Recognition of Phosphatidylinositol by Pulmonary Surfactant Protein D. *Biochemistry* 2007;46: 5160-5169.

D

Ducruix A. & Giegé R : Crystallisation of nucleic acids and proteins. A practical approach. Oxford University Press 1992.

Dalloul AH, Patry C, Salamero J, Canque B, Grassi F, Schmitt C. Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a- progenitor- derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. *J Immunol* 1999;162(10):5821-8.

Daniels BE, Nakamura MC, Rosen SD, Yokoyama WM, Seaman WE. Ly-49A, a receptor for H-2Dd, has a functional carbohydrate recognition domain. *Immunity* 1994;1: 785–792.

de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC

maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;9(3):325-36.

de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol.* 2006;80:3477-3486.

de Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TB. Distinct roles for DC-SIGN⁺-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med.* 2008;14(1):12-9.

de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, Piguet V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med.* 2007;13(3):367-71.

Deng Y, Zheng Q, Liu J, Cheng CS, Kallenbach NR, Lu M. Self-assembly of coiled-coil tetramers in the 1.40 Å structure of a leucine-zipper mutant. *Protein Sci.* 2007;16:323-328

Devlin JJ, Panganiban LC & Devlin PE. Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. *Science* 1990;249:404-406.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188(2):373-86.

Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000;192(5):705-18.

Doyle and O'Neill. Toll-like receptors: From the discovery of NF-κB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology* 2006;72(9):1102-1113.

Drickamer K, Dordal MS, Reynolds L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagen tails. *J Biol Chem* 1986;261:6878-6886.

Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 237-264.

Drickamer K. Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins, *Curr Opin Struct Biol* 1993; 3:393-400.

Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 1992; 360:183-186.

Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell.* 1998;94:667-677.

Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 1989;341:619-624.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165(11):6037-46.

Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, et al. Plasmacytoid dendritic cells from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002;63(12):1133-48.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001;194(12):1823-34.

E

Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*. 2002;168:2118-2126.

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RAB. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:29–35.

Erbe DV, Watson SR, Presta LG, Wolitzky BA, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA. P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* 1993;120:1227–1235.

Erbe DV, Wolitzky BA, Presta LG, Norton CR, Ramos RJ, Burns DK, Rumberger JM, Rao BN, Foxall C, Brandley BK. Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* 1992;119:215–227.

Estella A, Koppel, Irene S, Ludwig, Ben J, Appelmelk, Yvette van Kooyk and Teunis B.H. Geijtenbeek. Carbohydrate specificities of the murine DC-SIGN homologue mSIGNR1. *Immunobiology* 2005; 210 (2-4) :195-201.

Ezekowitz RAB, Day LE, Herman GA. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med* 1988; 167:1034–1046.

E

Facchetti F, De Wolf-Peeters C, De Vos R, van den Oord JJ, Pulford KA, Desmet VJ. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis. *Hum Pathol* 1989;20(6):588-93.

Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988;133(1):15-21.

Facchetti F, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, De vos R, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol* 1988;19(9):1085-92.

Facchetti F, De Wolf-Peters C, Marocolo D, De Vos R. Plasmacytoid monocytes in granulomatous lymphadenitis and in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Sarcoidosis* 1991;8(2):170-1.

Facchetti HP, Horst HA. Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986;409(2):275-86.

Fairman R, Chao HG, Mueller L, Lavoie TB, Shen L, Novotny J, Matsueda GR. Characterization of a new four-chain coiled-coil: influence of chain length on stability. *Protein Sci*. 1995;4(8):1457-69.

Fairman R, Chao HG, Mueller L, Lavoie TB, Shen L, Novotny J, Matsueda GR. Characterization of a new four-chain coiled-coil: influence of chain length on stability. *Protein Sci*. 1995;4(8):1457-69.

Feinberg H, Castelli R, Drickamer K, Seeberger PH, Weis WI. Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):4202-9.

Feinberg H, Guo Y, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1327-35.

Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*. 2001;294:2163-2166.

Feinberg H, Taylor ME, Weis WI. Scavenger receptor C-type lectin binds to the leukocyte cell surface glycan Lewis(x) by a novel mechanism. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):17250-8.

Fischer M & Vögtle F. Dendrimers: From design to applications – A progress report. *Angew. Chem., Int. Edn.* 1999;38 : 884–905.

Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993;60(1):39-62.

Fréchet JMJ. Functional polymers and dendrimers: Reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science* 1994;263 : 1710–1715.

Frison N, Taylor ME, Soilleux E, Bousser MT, Mayer R, Monsigny M, Drickamer K, Roche AC. Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23922-9.

G

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000;100:587-597.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000;100: 575-585.

Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Emgering A. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:33-54.

Guo Y, Feinberg H, Conroy E. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:591-598.

Gagliardi MC, Teloni R, Giannoni F. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN-dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J Leukoc Biol.* 2005;78:106-113.

Galy A, Christopherson I, Ferlazzo G, Liu G, Spits H, Georgopoulos K. Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* 2000;95(1):128-37.

Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995;3(4):459-73.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003;197:1107-1117.

Garnache-Ottou F, Thèse : Cellules Dendritiques Plasmocytoïdes : phénotype et fonction des leucémies aiguës dérivées de ces cellules / Réponse immune et potentiel tolérogène. Présentée et soutenue publiquement le 20 Décembre 2004 N°: 25-04-12.

Glatzer O, Kratky O. Small Angle X-ray scattering. London 1982 : Academic.

Gluckman JC, Canque B, Rosenzweig M. Dendritic cells: a complex simplicity. *Transplantation* 2002;73(1 Suppl):S3-6.

Gonzalez L Jr, Woolfson DN, Alber T. Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. *Nat Struct Biol.* 1996;3(12):1011-8.

Graddis TJ, Myszkowski DG, Chaiken IM. Controlled formation of model homo- and heterodimer coiled coil polypeptides. *Biochemistry.* 1993 Nov 30;32(47):12664-71.

Gramberg T, Soilleux E, Fisch T, Lalor PF, Hofmann H, Wheeldon S, Cotterill A, Wegele A, Winkler T, Adams DH, Pöhlmann S. Interactions of LSECtin and DC-SIGN/DC-SIGNR with viral ligands: Differential pH dependence, internalization and virion binding. *Virology.* 2008;373(1):189-201..

Graves BJ, et al. Insights into E-selectin/ligand interactions from the crystal structure and mutagenesis of the LEC/EGF domains. *Nature* 1994; 367: 532–538.

Green TW, PGM. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, 1999;518-525,736-739.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185(6):1101-11.

Guinier A et Fournet G. *Small-angle scattering of X-rays*. John Wiley et Fils ed 1955, New-york.

Guinier A. La diffraction des rayons X aux très petits angles : application à l'étude de phénomènes ultramicroscopique. *Ann. Phys.* 1939;12:161-237.

Guo Y,Feinberg H,Conroy E,Mitchell DA,Alvarez R,Blixt O,Taylor ME,Weis WI,Drickamer K. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(7):591-8.

H

Hamodrakas SJ, Alexandraki E, Troganis A, and Stassinopoulou CI. (1989) Models of binding of 4'-nitrophenyl R-Dmannopyranoside to the lectin concanavalin A. *Int. J. Biol. Macromol.* 11,17-22.

Haensler J & Szoka FC, Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 1993;4:372–379.

Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002;17(5):653-64.

Hawker CJ & Fréchet JMJ. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112:7638– 7647.

Hawker CJ & Fréchet JMJ. Unusual macromolecular architectures: The convergent growth approach to dendritic polyesters and novel block copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 1992;114:8405–8413.

Hawthorne MF. The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angew. Chem.* 1993;32:950–984.

Head JF, Mealy TR, McCormack FX, Seaton BA. Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J.Biol.Chem.* 2003;278: 43254-43260.

Hiramatsu Y, Tsujishita H, Kondo H. Studies on selectin blocker. 3. Investigation of the carbohydrate ligand sialyl LewisX recognition site of P-selectin. *J Med Chem* 1996; 39:4547–4553.

Hodge, P. Polymer science branches out. *Nature* 1993;362:18–19.

Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, Simmons A. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol.* 2007;8(6):569-77.

Hollenbaugh D, Bajorath J, Sienkamp R, Aruffo A. Interaction of P-selectin (CD62) and its cellular ligand: analysis of critical residues. *Biochemistry* 1993; 32: 2960–2966.

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human

peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168(9):4531-7.

Hu JC, Newell NE, Tidor B, Sauer RT. Probing the roles of residues at the e and g positions of the GCN4 leucine zipper by combinatorial mutagenesis. *Protein Sci.* 1993 Jul;2(7):1072-84.

I

Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 1987; 262:7451–7454.

Iobst ST, Drickamer K. Binding of sugar ligands to Ca²⁺-dependent animal lectins: II, Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1994; 269:15512–15519.

Iobst ST, Wormald MR, Weis WI, Dwek RA, Drickamer K. Binding of sugar ligands to Ca²⁺-dependent animal lectins: I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *J Biol Chem* 1994; 269:15505–15511.

Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon- α and interleukin12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195(11):1507-12.

Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, et al. A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 1999;163(3):1409-19.

J

Janin J. et Delepierre M : *Biologie Structurale. Principes et méthodes biophysiques.* Hermann, 1994.

Jansen JFGA & Meijer EW. The dendritic box: Shape-selective liberation of encapsulated guests. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;117:4417–4418.

Jansen JFGA, de Brabander van den Berg EMM. & Meijer EW. Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science* 1994;266:1226–1229.

Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31(11):3388-93.

Jiang W, et al. The receptor DEC-20S expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375:151–155.

Jiménez-Barbero J, Asensio JL, Cañada FJ, Poveda A. Free and protein-bound carbohydrate structures. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9(5):549-55.

Johnsson, B. et al Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry* 1991;198:268-277.

Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B, Johnsson B and Karlsson R. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 1991;11:620-627.

K

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194(6):863-9.

Kaila N, Janz K, Huang A, Moretto A, DeBernardo S, Bedard PW, Tam S, Clerin V, Keith JC, Tsao DHH, Sushkova N, Shaw GD, Camphausen RT, Schaub RG, Wang Q. *J. Med. Chem.* 2007;50:40-64.

Kaila N, Janz K, DeBernardo S, Bedard PW, Camphausen RT, Tam S, Tsao DHH, Keith JC, Nickerson-Nutter C, Shilling A, Young-Sciame R, Wang QJ. *Med. Chem.* 2007;50:21-39.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88:3259–3287.

Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers : properties and applications. *Acta Biochemica Polonica* 2001;48(1):199-208.

Knapen JWJ, van der Made AW, de Wilde JC, van Leeuwen, PWNM, Wijkens P, Grove DM & van Koten G. Homogenous catalysts based on silane dendrimers functionalized with arylnickel(II) complexes. *Nature* 1994;372:659–663.

Kogan TR, Revelle BM, Tapp S, Scott D, Beck PJ. A single amino acid residue can determine ligand specificity of E-selectin. *J Biol Chem* 1995; 270:14047–14055.

KolatkAR, Weis WI. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *J Biol Chem* 1996; 271:6679–6685.

Koppel EA, Saeland E, de Cooker DJ. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology.* 2005;210:203-210.

Koranev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ et Svergun DI. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 2003;36: 1277-82.

Kraulis PJ. MOLSCRIPT; a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst* 1991; 24: 946–950.

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31(10):3026-37.

Kukowska-Latallo JF, Raczka E, Quintana A, Chen CL, Rymaszewski M & Baker JR. Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector. *Hum. Gene Therapy* 2000;11:1385–1395.

Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* 2002;16(1):135-44.

L

Lam KS, Salmon ES, Hersch, EM, Hruby VJ, Kazmierski WM & Knapp R J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 1991;354,82-84.

Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 2001;13(3):291-8.

Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:113–139.

Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, Flummerfelt K, Swiggard W, Coleman N, Malim M, Doms RW. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol.* 2001;75(24):12028-38.

Lee RT, Ichikawa Y, Fay M, Drickamer K, Shao M-C, Lee YC. Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). *J Biol Chem* 1991;266: 4810–4815.

Lee RT, Ichikawa Y, Kawasaki T, Drickamer K, Lee YC. Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299: 129–136.

Lee YC, Lee RT, Rice K, Ichikawa Y, Wong T-C. Topography of binding sites of animal lectins: ligands' view. *Pure Appl Chem* 1991; 63:499–506.

Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1975;1(7914):1031-2.

Lennert K. [Early changes of lymphogranulomatosis.]. *Frankf Z Pathol* 1958;69(1):103-22.

Lipfert J and Doniach S. Small-Angle X-Ray Scattering from RNA, Proteins, and Protein complexes. *Ann.Rev.Bioph and Biomol.Struc.* 2007;36:307-327.

Liu L, Barth RF, Adams DM, Soloway AH & Reisefeld RA. Bispecific antibodies as targeting agents for boron neutron capture therapy of brain tumors. *J. Hematotherapy* 1995;4: 477–483.

Liu W, Zhou T, Shi H. Cell adhesion and the mechanisms of dendritic cells immigration. *Sheng Ming Ke Xue.* 2002;14: 379-382.

Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001;2(7):585-9.

Loeb JA, Drickamer K. Conformational changes in the chicken receptor for endocytosis of glycoproteins. *J Biol Chem* 1988; 263:9752–9760.

Lofas S & Johnsson B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J.chem.soc., chem commun.* 1990;1526-1528.

Lowey S. comparative study of the alpha-helical muscle proteins. Tyrosyl titration and effect of pH on conformation. *J Biol Chem.* 1965;240:2421-7.

Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foug S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem.* 2003;278(22):20358-66.

Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJ, Depraetere S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J Virol.* 2004;78(15):8322-32.

Lupas A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(10):375-82.

Lupas A. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 1996;266:513-25.

M

Maeda N, Nigou J, Herrmann JL. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem.* 2003;278:5513-5516.

Malhotra R, Laursen SB, Willis AC, Sim RB. Localization of the receptor-binding site in the collectin family of proteins. *Biochem J* 1993; 293:15–19.

Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W & Duncan R. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Controlled Release* 2000; 65 : 133–148.

Malmqvist M. Kinetic analysis of engineered antibody-antigen interactions. *J Mol Recognit.* 1994;7(1):1-7.

Marieb EN, Anatomie et physiologie humaines, 6^{ème} édition, Pearson Education.

Marquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, Lopez-Botet M, et al. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 1998;91(8):2760-71.

Martinez O, Brackenridge S, El-Idrissi El-Azami. DC-SIGN, but not sDC-SIGN, can modulate IL-2 production from PMA- and anti-CD3-stimulated primary human CD4 T cells. *Int Immunol.* 2005;17:769-778.

Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10(5):399-415.

McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science.* 2003;300(5623):1295-7.

Mcever RP. Selectin. In: Beckerle MC. *Cell adhesion.* Oxford: Oxford University Press. 2001;30-61.

McKenzie, E.J. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J. Immunol.* 2007;178:4975–4983.

McLachlan AD, Stewart M. Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J Mol Biol.* 1975;98(2):293-304.

McPherson A, Malkin AJ, Kuznetsov YG : The science of macromolecular crystallization. *Structure* 1995;3:759–768.

Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of alpha-helical chains in two-stranded alpha-helical coiled-coils. *Biochemistry* ;33(13):3862-71.

Monera OD, Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization. *J Biol Chem.* 1993 Sep 15;268(26):19218-27.

Moris A, Nobile C, Buseyne F, Porrot F, Abastado JP, Schwartz O. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood.* 2004;103(7):2648-54.

Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood.* 2006 Sep 1;108(5):1643-51.

Mourey TH, Turner SR, Rubenstein M, Fréchet JMJ, Hawker CJ & Wooley KL. Unique behaviour of dendritic macromolecules: Intrinsic viscosity of polyether dendrimers. *Macromolecules* 1992;25:2401–2406.

Mullin NP, Hitchen PG, Taylor ME. Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a G-type carbohydrate recognition domain of the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1997;272:5668–5681.

Mullin NR, Hall KT, Taylor ME. Characterization of ligand binding to a carbohydrate recognition domain of the macrophage receptor. *J Biol Chem* 1994;269:28405–28413.

Mummidi S, Catano G, Lam L, Hoefle A, Telles V, Begum K, Jimenez F, Ahuja SS, Ahuja SK. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):33196-212.

N

Nagorsen D, Keiholz U, Rivoltini L. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000;60:4850-4854.

Nakayama E, von Hoegen I, Parnes JR. Sequence of the Lyh-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1352–1356.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003;4(7):723-8.

Newkome GR, Yao, ZQ, Baker GR & Gupta VK. Cascade molecules: A new approach to micelles, A[27]-arborol. *J. Org. Chem.* 1985;50 : 2003–2006.

Ng KK, Drickamer K, Weis WI. Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J Biol Chem.* 1996;271(2):663-74.

Ng KK-S, Weis WI. Structure of a selectin-like mutant of mannose-binding protein complexed with sialylated and sulfated Lewisx oligosaccharides. *Biochemistry* 1997;36: 979–988.

Ng, KK, Drickamer K, Weis WI. Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J.Biol.Chem.* 1996;271:663-674.

O

O'Connell PJ, Li W, Wang Z, Specht SM, Logar AJ, Thomson AW. Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 2002;168(1):143-54.

Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(23):12551-6.

O'Shannessy DJ. Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature. *Curr Opin Biotechnol.* 1994;5(1):65-71.

O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science.* 1991;254(5031):539-44.

O'Shea EK, Lumb KJ, Kim PS. Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil. *Curr Biol.* 1993;3(10):658-67.

O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell.* 1992;68(4):699-708.

Osugi Y, Vuckovic S, Hart DN. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 2002;100(8):2858-66.

Otter M, Barrett-Bergshoeff MM, Rijken DC. Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose-receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 13931–13935.

P

Patterson S. Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):273-4.

Pedersen JS. A flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle X-ray scattering camera for solution scattering. *J.Appl. Cryst* 2004, 37:369.

Petoukhov MV, Svergun DI. New methods for domain structure determination of proteins from solution scattering data. *J. Appl.Crystallogr.* 2003;36:540-44.

Poppe L, Brown GS, Philo JS, Nikrad PV, Shah BH. Conformation of sLex tetrasaccharide, free in solution and bound to E-, P-, and L-selectin. *J Am Chem Soc* 1997; 119:1727–1736.

Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Stewart PL, Behar SM, Porcelli SA, Brenner MB, Modlin RL, Kronenberg M. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 1997;6(2):187-97.

R

Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 2006;176:1741-1749.

Reid SD, Penna G, Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2000;12(1):114-21.

Res P, Martinez-Caceres E, Cristina Jaleco A, Staal F, Noteboom E, Weijer K, et al. CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996;87(12):5196-206.

Res PC, Couwenberg F, Vyth-Dreese FA, Spits H. Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 1999;94(8):2647-57.

Roberts JC, Bhalgat, MK & Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyaminoamine (PAMAM) Starburst TM dendrimers. *J. Biomed. Material Res.* 1996; 30 : 53–65.

Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29(9):2769-78.

Roseman S. Reflections on glycobiology. *J Biol Chem.* 2001; 276(45):41527-42.

Rosen SD, Bertozzi CR. Leukocyte adhesion: two selectins converge on sulphate. *Curr Biol* 1996; 6: 261–264.

Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Struct Biol* 1994; 4: 663–673.

Roy R, Zanini D, Meunier SJ & Romanowska A. Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993;1869–1872.

Ryan JC, Seaman WE. Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev* 1997;155: 79–89.

S

Sallusto E, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389–400.

Scheffler K. Determination of the bioactive conformation of the carbohydrate ligand in the E-selectin/sialyl Lewisx complex. *Angew Chem Int Ed Engl* 1995;34:1841–1844.

Schmidt TGM, Koepke J, Frank R & Skerra A. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 199; 255:753-766.

Schmidt TGM. & Skerra A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Prot. Engineering* 1993;6:109-122.

Schmidt, TGM & Skerra A. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the Strep tag and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr.* 1994;A676:337-345.

Schuermann M, Hunter JB, Hennig G, Müller R. Non-leucine residues in the leucine repeats of Fos and Jun contribute to the stability and determine the specificity of dimerization. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(4):739-46.

Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, Jackson H, Dimopoulos N, Tai T, et al. The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immunol.* 2004;4:9.

Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz RAB. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1994; 1: 789-794.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284(5421):1835-7.

Sigal GB, Mammen M, Dahmann G & Whitesides GM. Polyacrylamides bearing pendant -sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus: The strong inhibition reflects enhanced binding through cooperative polyvalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 1996;118 :3789-3800.

Sinay P. Recent advances in the synthesis of carbohydrate mimics. *Pure & appl. Chem.* 1998; 70, 8 : 1495-1499.

Sinnott ML. Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 1990;90: 1171-1202.

Skerra A & Schmidt TGM. Applications of a Peptide Ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomolecular Engineering* 1999;16,79-86.

Smith AL, Ganesh L, Leung K, Jongstra-Bilen J, Jongstra J, Nabel GJ. Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. *J Exp Med.* 2007;204(2):421-30.

Snyder GA, Colonna M, Sun PD. The structure of DC-SIGNR with a portion of its repeat domain lends insights to modeling of the receptor tetramer. *J Mol Biol.* 2005;347(5):979-89.

Snyder GA, Ford J, Torabi-Parizi P, Arthos JA, Schuck P, Colonna M, Sun PD. Characterization of DC-SIGN/R interaction with human immunodeficiency virus type 1 gp120 and ICAM molecules favors the receptor's role as an antigen-capturing rather than an adhesion receptor. *J Virol.* 2005;79(8):4589-98.

Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y, Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity.* 2002;16(1):145-55.

Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 1999;93(7):2302-7.

Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000;192(12):1775-84.

Stahl PD, Schlessinger PH. Receptor-mediated pinocytosis of mannose/N-acetylglucosamine-terminated glycoproteins and lysosomal enzymes by macrophages. *Trends Biochem Sci* 1980;5:194-196.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):351-8.

Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer RA. Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol.* 2000 Sep;7(9):772-6.

Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer, R.A. Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat.Struct.Biol.*2000;7:772-776.

Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF. Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* 1998;161(2):740-8.

Summerfield J. The role of mannose-binding protein in host defence. *Biochem Soc Trans* 1993;21:473–477.

Svergun DI, Peutoukhov MV et Koch MHJ. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophys J* 2001;80:2946-53.

Svergun DI, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* 1999, 76 : 2879-86.

Svergun DI, Stuhrmann HB. New developpement in direct shape determination from small-angle X-ray scattering. Theory and model-calculations. *Acta.crystallogr. A* 1991;47:736-44.

Svergun DI. Determination of regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst* 1992, 25 : 495-503.

I

Takayama Y, Takada F, Takahashi A, Kawakami M. A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to Cir and C1s. *J Immunol* 1994;152: 2308–2316.

Takei F, Brennan J, Mager DL. The Ly-49 family; genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* 1997; 155: 67–77.

Tardieu A, Bonnete F, Finet S et Vivares D. Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002;58:1549-53.

Taylor ME, Bezouska K, Drickamer K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1992; 267:1719–1726.

Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl P, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* 1990; 265:12156–12162.

Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1993; 268:399–404.

Taylor ME. Carbohydrate-recognition proteins of macrophages and related cells. In: Horton MA, ed. *Blood cell biochemistry*. Vol 5.

Taylor ME. Evolution of a family of receptors containing multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *Glycobiology* 1997;7:R5–R8.

Taylor, P.R. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 2005;26:104–110.

Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RA. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126, 000 M(r) component of the C1 q receptor. *Immunity* 1995; 3:485–493.

Thiel S, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; 386: 506–510.

Thomas GM Schmidt & Arne Skerra. The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols* 2007; 2:1528 – 1535.

Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Qian S, et al. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):322-30.

Thomson AW, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Lu L. Immunobiology of liver dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;80(1):65-73.

Tomalia DA & Dvornic PR. What promise for dendrimers? *Nature* 1994;372:617–618.

Tomalia DA, Baker H, Dewald JR, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J. & Smith P. A new class of polymers: Starburst- dendritic macromolecules. *Polym. J.* 1985;17: 117–132.

Tomalia, DA Naylor AM & Goddard III WA. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew. Chem., Int. Edn.* 1990;29:138–175.

Torgersen D, Mullin NP, Drickamer K. Mechanism of ligand binding to E- and P-selectin analyzed using selectin/mannose-binding protein chimeras. *J Biol Chem* 1998;273: 6254–6261.

Tormo J, Natarajan K, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* 1999;402(6762):623-31.

Turville S, Wilkinson J, Cameron P. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2003;74:710-718.

Turville SG, Arthos J, Donald KM. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood.* 2001;98:2482-2488.

Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stössel H, Romani N, Piatak M Jr, Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood.* 2004;103(6):2170-9.

V

van Gisbergen KP, Aarnoudse CA, Meijer GA. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcino- embryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res.* 2005;65:5935-5944.

van Gisbergen KP, Ludwig IS, Geijtenbeek TB. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 2005;579:6159-6168.

van Gisbergen KP, Paessens LC, Geijtenbeek TB. Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunol Lett.* 2005;97:199-208.

Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7390–7397.

Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature.* 2001;412 :6849,835-8.

Voss S & Skerra A. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 1997;10,975-982.

W

Wallis R, Drickamer K. Asymmetry adjacent to the collagen-like domain in rat liver mannose-binding protein. *Biochem J* 1997;325:391–400.

Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA, Gleish GJ, Prendergast FG, McKean DJ. Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 1988; 263: 12559–12563.

Weener JW, van Dongen, JIJ. & Meijer EW. Electrospray mass spectrometry studies of poly(propylene imine) dendrimers: Probing reactivity in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.* 1991;121:10346–10355.

Weis WI, Crichlow GV, Murthy HMK, Hendrickson WA, Drickamer K. Physical characterization and crystallization of the carbohydrate-recognition domain of a mannose-binding protein from rat. *J Biol Chem* 1991;266:20678–20686.

Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 1992;360:127–134.

Weis WI, Drickamer K, Hendrickson, WA. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 1992;360:127–134.

Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* 1996;65:441–473.

Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* 1994;2:1227–1240.

Weis WI, Kahn R, Fourme R, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 1991;254:1608–1615.

Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 1998;163:19–34.

Weis WI. Lectins on a roll: the structure of E-selectin. *Structure* 1994;2:147–150.

Wiener EC, Auteri FP, Chen, JW, Brechbiel MW, Gansow OA, Schneider DS, Belford, RL, Clarkson RB & Lauterbur PC. Molecular dynamics of ion-chelate complexes attached to dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* 1996;118:7774–7782.

Wilchek M and Bayer EA. Protein Recognition of Immobilized Ligands. Hutchins, TW, ed. Alan R. Liss, Inc. 1989;pp. 83–90.

Y

Yadav MK, Redman JE, Leman LJ, Alvarez-Gutierrez JM, Zhang Y, Stout CD, Ghadiri MR. Structure-based engineering of internal cavities in coiled-coil peptides. *Biochemistry* 2005;44: 9723–9732.

Z

Zanini D & Roy R. Practical synthesis of Starburst PAMAM -thiosialodendrimers for probing multivalent carbohydrate-lectin binding properties. *J. Org. Chem.* 1998;63:3486–3491.

Zhang Y, Harada A, Wang JB, Zhang YY, Hashimoto S, Naito M, et al. Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit⁺ bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998;92(1):118–28.

Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(6):2588–92.

Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. Synthetic model proteins: the relative contribution of leucine residues at the nonequivalent positions of the 3-4 hydrophobic repeat to the stability of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry*. 1992;31(25):5739-46.

Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. The net energetic contribution of interhelical electrostatic attractions to coiled-coil stability. *Protein Eng*. 1994;7(11):1365-72.

Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Mol Biol*. 1994;237(4):500-12.

Zhou NE, Zhu BY, Kay CM, Hodges RS. The two-stranded alpha-helical coiled-coil is an ideal model for studying protein stability and subunit interactions. *Biopolymers*. 1992;32(4):419-26.

Zhuo RX, Du B & Lu ZR. In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J. Controlled Release* 1999;57, 249–257.

Annexes et Glossaire

Annexes et Glossaire :

1-Les macrophages :

Le mot macrophage dérivé du grec signifie "gros mangeur", et sont des cellules infiltrant les tissus, découvertes par Elie Metchnikoff en 1883. Ils proviennent de la différenciation de leucocytes sanguins, les monocytes, une fois dans l'endothélium vasculaire. Ils participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative via le phénomène d'opsonisation. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes. À l'instar des cellules dendritiques, ils sont capables de se comporter comme cellules présentatrices d'antigènes. C'est une grosse cellule arrondie avec un noyau excentré et des vacuoles dans son cytoplasme.

2-Granulocyte éosinophile:

Les granulocytes éosinophiles ou polynucléaires éosinophiles (ou plus simplement « éosinophiles ») sont des cellules sanguines de la lignée blanche (ou leucocytes), ayant donc un rôle dans le système immunitaire. On les appelle polynucléaires en raison d'une erreur historique : de par le caractère lobé de leur noyau (deux lobes en général), on a longtemps cru que ces cellules possédaient plusieurs noyaux. Le qualificatif d'« éosinophile » vient aussi d'une caractéristique visible en microscopie optique : après ajout des colorants vitaux usuels, ces cellules se colorent en rouge (leurs inclusions cytoplasmiques fixent l'éosine, ils sont acidophiles). Les autres granulocytes sont les granulocytes neutrophiles et basophiles.

Leur rôle essentiel est de s'attaquer aux parasites de l'organisme, sans les phagocyter : ils se fixent dessus, déversent leurs granules qui contiennent des enzymes destinées à les détruire.

Les vacuoles contenues dans leur cytoplasme contiennent des substances toxiques (histamine entre autres) pour les parasites (mais aussi contre l'organisme hôte). Ils jouent aussi un rôle (mineur) dans l'allergie, et dans l'inflammation.

Une augmentation de la population d'éosinophiles est appelée « éosinophilie », que l'on rencontre classiquement chez les individus atteints de maladies parasitaires. D'autres causes sont possibles :

- * allergie (asthme, eczéma, urticaire, allergie médicamenteuse). Les éosinophiles se concentrent facilement dans les sites des réactions allergiques. On constate par ailleurs une hyperproduction de ces leucocytes ce qui se traduit par une éosinophilie sanguine parfois importante.

- * leucémies, cancers,

- * maladies inflammatoires : lupus, périartérite noueuse, sarcoïdose,

- * maladies de la peau : pemphigus, polymyosite.

3-Les granulocytes basophiles:

Les granulocytes basophiles ou polynucléaires basophiles (ou plus simplement « basophiles ») sont des leucocytes (cellules sanguines de la lignée blanche), ayant un rôle dans le système immunitaire. On les appelle polynucléaires en raison d'une erreur historique : de par le caractère lobé de leur noyau (deux lobes en général), on a longtemps cru que ces cellules possédaient plusieurs noyaux. Le qualificatif de « basophile » vient aussi d'une caractéristique visible en microscopie optique : après ajout des colorants vitaux usuels, ces cellules se colorent en bleu (leurs grandes inclusions cytoplasmiques fixent les colorants bleus). Les inclusions cytoplasmiques contiennent de nombreuses molécules chimiques, et en particulier histamine, sérotonine, et héparine. L'histamine et l'héparine servent à empêcher la coagulation dans les vaisseaux sanguins, mais aussi à augmenter la perméabilité des capillaires, ouvrant ainsi la voie à la diapédèse.

L'histamine active la réaction inflammatoire et intervient également dans les réactions allergiques. Lorsqu'ils quittent les vaisseaux pour rejoindre les tissus, les basophiles se transforment en mastocytes. Ces cellules activées jouent un rôle majeur dans l'inflammation, capables de relarguer leurs vacuoles au contact d'allergènes auxquels ils sont sensibles.

4-Les lymphocytes T:

Également appelés thymocytes ou cellules T, c'est une catégorie de lymphocytes qui joue un grand rôle dans la réponse immunitaire primaire mais également secondaire. "T" est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève. Elles sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules (bactéries, cellules cancéreuses) reconnues comme étrangères (c'est-à-dire autres que celles que les cellules T ont appris à tolérer lors de leur maturation) sont détruites par un mécanisme complexe.

Il y a plusieurs types de cellules T:

- * Les lymphocytes CD8: évoluant en cellules T cytotoxiques ou lymphocytes tueurs détruisent les cellules infectées. Ces cellules fonctionnent comme des cellules tueuses ('killer' en anglais) ou cytotoxiques car elles sont à même de détruire des cellules cibles qui expriment des antigènes spécifiques qu'elles reconnaissent, en libérant une substance chimique, la perforine, qui s'insère dans la membrane plasmique et la perce, ce qui provoque l'explosion de la cellule par un afflux massif d'eau dû aux pressions osmotiques.

- * Les lymphocytes CD4: évoluant en lymphocytes T auxiliaires ou lymphocytes sécréteurs (en anglais T-Helper) sont des intermédiaires de la réponse immunitaire qui prolifèrent après contact avec l'antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigènes (CPA) pour activer quantité d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Les cellules CD4+ régulent ou 'aident' à la réalisation d'autres fonctions lymphocytaires. On sait qu'elles sont une cible du VIH (avec les macrophages) ; la chute de leur population est l'un des symptômes du SIDA.

- * Les lymphocytes T suppresseurs: mettent un terme à la réponse immunitaire dès qu'un antigène a été éliminé du corps.

- * Les lymphocytes T régulateurs: aident à prévenir l'activation des lymphocytes auto-immuns qui détruisent les cellules de leur propre organisme.

5-Les lymphocytes B:

Les lymphocytes B achèvent leur maturation et deviennent immunocompétents dans la moelle osseuse. Ces globules blancs ont pour rôle de fabriquer des protéines de la famille des immunoglobulines appelées anticorps : ils sont donc responsables de l'immunité humorale. Pour être actifs, d'autres globules blancs tels que les macrophages, doivent leur présenter des fragments d'antigène, afin qu'ils se transforment en plasmocytes. Les plasmocytes possèdent bien plus de vésicules de Golgi, qui permettent de fabriquer des anticorps en masse (jusqu'à 5000 anti-corps par seconde), afin de neutraliser efficacement les antigènes. Les plasmocytes sont donc des lymphocytes B activés et capables de produire des anticorps dirigés contre l'antigène activateur.

Les lymphocytes B sont des cellules participant à la réponse immunitaire spécifique, c'est-à-dire, qu'après avoir reconnu un antigène, le lymphocyte B ne peut plus fabriquer des anticorps que contre l'antigène qui lui avait présenté.

Les cellules B sont des lymphocytes qui jouent un grand rôle dans l'immunité humorale (par opposition à l'immunité cellulaire). Le corps humain produit des centaines de types différents de cellules B, et chaque type a sur sa membrane une protéine réceptrice unique, qui se liera à un antigène particulier; à chaque instant des millions de cellules B circulent dans le sang et la lymphe, sans produire d'anticorps. Il y a deux types de cellules B:

* Les plasmocytes sécrètent des anticorps qui se chargent de la destruction des antigènes en se liant à ceux-ci afin qu'ils deviennent des proies plus faciles pour les phagocytes.

* Les cellules B mémoire sont formées spécifiquement contre les antigènes rencontrés lors de la réponse immunitaire primaire; comme elles peuvent vivre longtemps, ces cellules peuvent réagir rapidement lors d'une seconde exposition à leur antigène spécifique.

6-Les lymphocytes NK:

Les lymphocytes NK (Natural Killer, c'est-à-dire "cellules tueuses naturelles"), sont des cellules de l'immunité innée des mammifères. Ce sont des lymphocytes caractérisés chez l'humain par le marqueur CD56.

Ils sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable, au contraire des lymphocytes T et B. Par leur fonction de lyse, on peut les rapprocher des lymphocytes T CD8+, mais la reconnaissance de la cible des NK est très différente de celle des lymphocytes T. En effet, là où les lymphocytes T reconnaissent et ne s'attaquent qu'aux cellules portant un peptide particulier présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, les cellules NK sont spontanément lytique envers toutes les cellules. Cependant, de nombreux mécanismes de régulation empêchent les NK de s'attaquer aux cellules saines.

Les cellules NK peuvent reconnaître les cellules cibles potentielles de deux façons différentes :

-Il existe sur la membrane cellulaire des NK des récepteurs activateurs (portant des séquences "ITAM" : immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ou inhibiteurs (portant des séquences "ITIM" : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Lorsqu'un NK rencontre une autre cellule, la lyse de cette cellule ne se produira que si les signaux d'activation surpassent les signaux d'inhibition. Le principal signal inhibiteur est produit par les récepteurs KIR (acronyme de l'anglais "Killer cell Ig-like Receptor"), portés par le NK, qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I. L'activation d'un seul type de récepteur KIR suffit à empêcher l'activation du NK alors qu'il faut toujours plusieurs signaux activateurs différents pour provoquer la dégranulation du NK et la mort de la cellule non reconnue. Les signaux d'activation sont variés, et comportent notamment des protéines produites par des cellules stressées, comme par exemple lors d'une infection. Ce système d'équilibre dynamique activation/inhibition permet en pratique aux cellules NK de lyser toute cellule dépourvue des molécules du CMH de classe I (donc théoriquement tout parasite extracellulaire) ou cellules infectées par des virus ou des bactéries tout en épargnant les cellules saines.

-Une autre voie par laquelle les cellules NK reconnaissent les cellules cibles potentielles dépend du fait que des cellules tumorales et des cellules infectées par certains virus exposent des antigènes contre lesquels le système immunitaire a développé une réponse anticorps, de telle façon que des anticorps antitumoraux ou antiviraux soient liés à leur surface. Etant donné que les cellules NK expriment le CD16, qui est un récepteur membranaire à l'extrémité carboxy-terminale de la molécule d'IgG, appelée Fc (cf. anticorps), elles peuvent fixer à ces anticorps et, par la suite, lyser les cellules ainsi marquées. Ceci est un exemple d'un processus connu sous le nom de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity).

La lyse des cellules cibles se fait principalement par les voies perforine/granzyme, mais également par la voie Fas.

7-Immunité humorale:

Un lymphocyte B immunocompétent mais naïf est activé (stimulé pour se différencier) lorsque des antigènes se lient aux récepteurs adjacents de sa membrane. La liaison de l'antigène est immédiatement suivie de l'endocytose par récepteurs interposés des complexes antigène-récepteur. Ces événements (ainsi qu'une interaction avec les lymphocytes T) vont conduire à un processus de sélection clonale, c'est-à-dire qu'ils stimulent la croissance et la mitose rapide du lymphocyte B pour former une armée de cellules identiques possédant les mêmes récepteurs spécifiques de l'antigène qui a déclenché le processus. La plupart des cellules clones deviennent des plasmocytes, les cellules effectrices de la réaction humorale qui secrète des anticorps. Même si les lymphocytes B ne secrètent que des quantités limitées d'anticorps, les plasmocytes élaborent une machinerie complexe nécessaire à la synthèse d'anticorps à un rythme extraordinaire (2000 molécules/seconde). Certains lymphocytes du clone ne se transforment pas en plasmocytes et deviennent des cellules mémoires à durée de vie prolongée qui peuvent entraîner une réaction humorale quasi immédiate si elles rencontrent de nouveau le même antigène.

8-La cytotoxicité cellulaire:

Une cellule T cytotoxique (ou cellule TC) est un lymphocyte T (un type de leucocyte) qui présente à sa surface des récepteurs pouvant se lier à des complexes formés par un peptide présenté par une molécule CMH de classe I. Une fois activées par un complexe CMH-antigène, les cellules TC libèrent la perforine, une protéine qui est responsable de la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules-cibles ; cela fait entrer des ions et de l'eau dans la cellule-cible, si bien qu'elle enfle et éventuellement lyse. Les TC libèrent également la granzyme, une protéase à la sérine, capable de pénétrer dans la cible par les pores formés par la perforine et induire l'apoptose (mort cellulaire programmée). La surface de la plupart des cellules TC possède la protéine CD8, qui est attirée vers des portions de la molécule de classe I MHC. Cette affinité entraîne une liaison étroite entre la cellule TC et sa cellule-cible lors de l'activation antigène-spécifique. L'association d'une cellule TC avec une protéine de surface CD8 est appelée cellule CD8+ T.

9-Les « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs):

Il s'agit des motifs reconnus par les PRRs. Elles comportent entre autres: le lipopolysaccharide bactérien (LPS) considéré comme le prototype de PAMP. D'autres PAMPs incluent la flagelline bactérienne, l'acide lipoteichoïque des bactéries à Gram positif, les peptidoglycanes, et les acides nucléiques variants normalement associés à des virus, comme l'ARN double brin (dsRNA) ou les motifs CpG .

10-Les « Pattern recognition receptors » (PRRs):

Il s'agit des récepteurs qui reconnaissent les PAMPs. Les PRRs sont classés selon la spécificité de leur ligand, leur fonction et leur localisation/évolution.

Ainsi deux familles de PRRs sont identifiées :

- les PRRs responsables de la signalisation : comme les récepteurs cytoplasmiques NOD-Like et les récepteurs de la membrane Toll-Like (TLRs).
- les PRRs responsables de l'endocytose : ce sont ceux qui reconnaissent les motifs glycosidiques (les récepteurs au mannose), et les récepteurs « scavenger » présent à la surface des cellules phagocytaires.

Ils sont classés selon deux types de PRRs :

*Les PRRs associés à la membrane :

-Les TLRs :

Au départ, découverts chez les drosophiles comme étant responsable de la synthèse et de la sécrétion des cytokines et l'activation de la défense immunitaire innée et adaptative, ils ont également été identifiés chez les mammifères. Ils existent 11 types de TLR (TLR1-TLR11). L'interaction de TLRs avec des PAMPs spécifiques induit le système de signalisation $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, la voie MAP kinase et ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des molécules de co-stimulation. Ces molécules libérées suite à l'activation du TLR sont la clé de la défense du système immunitaire adaptatif et inné.

-Les récepteurs mannoses (MR):

Ce sont des récepteurs présents à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. Ils reconnaissent et lient des motifs glycosidiques à la surface des agents infectieux et stimulent l'activation du mécanisme d'endocytose et de phagocytose des microbes. Les MRs, comme les TLRs, établissent un lien entre l'immunité innée et adaptative.

*Les PRRs cytoplasmiques:

-Les récepteurs NOD-Like(NLRs) :

Les (NLRs) sont des protéines cytoplasmiques qui ont des fonctions multiples dans la régulation de l'inflammation et de la réponse apoptotique. Il existe approximativement 20 membres de cette protéine identifiés dans le génome des mammifères et divisés en 2 sous-familles appelées NODs et NALPs. On suppose que ces protéines reconnaissent des molécules endogènes, microbiennes et forment des oligomères qui activent les caspases inflammatoires (caspase 1) qui cause la coupure et l'activation des cytokines inflammatoires comme les IL-1, et/ou active la voie de signalisation $\text{NF-}\kappa\text{B}$ qui induit la production des molécules inflammatoires.

*NODS

Ces ligands sont connus pour le NOD1 et NOD2. Les protéines NOD1 reconnaissent une molécule nommée méso-DAP, un peptidoglycane qui est un constituant uniquement présent chez les bactéries à Gram négatifs. Les protéines NOD2 reconnaissent le MDP intracellulaire (muramyl dipeptide), un peptidoglycane qui est un constituant des deux types de bactéries Gram positive et Gram négative. NODs traduit un signal dans les voies $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et MAP kinases via des kinases sérine-thréonine appelées RIP2. Les protéines NODs contiennent un site d'oligomérisation qui lie un nucléotide triphosphate. Les NODs envoient leur signal via le domaine N-terminal CARD qui active ultérieurement des gènes spécialisés dans le processus inflammatoire, et interagissent avec les molécules microbiennes par sa région C-terminale qui comporte un motif répété riche en leucine (LRR).

*NALPS

Comme les NODs, ces protéines contiennent un domaine C-terminal LRRs, qui se comporte comme un domaine de régulation et peut être impliqué dans la reconnaissance des pathogènes. Comme les NODs, ces protéines comportent également un site de fixation de nucléotide (NBS) pour les nucléotides triphosphates. L'interaction avec d'autres protéines est réalisée via le domaine pyrine (PYD) de l'extrémité N-terminale. Il existe 14 membres de cette famille chez les humains (NALP1 to NALP14).

*Les PRRs sécrétés:

Il s'agit des récepteurs du Complément, les collectines, les protéines pentraxines comme le sérum amyloïde et la protéine C-réactive, la lipase transférase et les protéines de reconnaissance des peptidoglycans (PGRs). Une des collectines est très importante, il s'agit du mannan-binding lectin (MBL), qui est un PRR majeur de l'immunité innée qui lie une

grande gamme de bactéries, virus, fongites et des protozoaires . MBL reconnaît d'une façon dominante certains groupes sucrés présents à la surface des microorganismes, mais elle lie également des phospholipides, des acides nucléiques et des protéines non-glycosylés.

11-La tolérance Centrale:

La tolérance centrale a lieu quand les lymphocytes se développent et opère dans le thymus et la moelle osseuse. Ici, les lymphocytes T et B qui reconnaissent les antigènes du soi sont supprimés avant leur développement totale en des cellules immunocompétentes. Ce processus est majoritairement active à la vie foetal, mais continue tout le long de la vie où des lymphocytes immature sont générés.

12-La tolérance Peripherique:

La tolérance peripherique est une tolérance immunologique développée après que les lymphocytes T et B mature ont rejoint la circulation peripherique. Ces cellules sont alors contrôlées par un mécanisme de tolérance spécifique. Cela inclut la suppression des cellules autoréactives par des lymphocytes T "régulateur" et la génération de l'hyporesponsivité (anergy) chez les lymphocytes qui croisent des antigènes en absence des signaux de co-stimulation responsable de l'inflammation.

13-Les CMHs :

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) expriment à leurs surface des structures polypeptidiques, soit le CMH I (CMH de classe I'), soit les CMH I et CMH II (CMH de classe I et de classe II). L'association des deux permet de présenter le code peptidique d'un l'antigène du non-soi, qui sera reconnu par la suite par les lymphocytes et ou des macrophages (ce qui aura pour fonction de les activer en lançant la réaction immunitaire). Toutes les cellules possèdent le CMH I, quelques une possèdent aussi le CMH II comme les cellules dendritiques, les monocytes et macrophages, les lymphocytes B et les granulocytes.

CMH I

Le CMH I est une molécule retrouvée à la surface de toutes les cellules nucléées de notre organisme. Il est composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta microglobuline. Il est exprimé de façon quasi-ubiquitaire. Sa poche à peptides peut contenir un peptide de 9 acides aminés. Il est reconnu par les lymphocytes T CD8 (notés parfois LT8). Une diminution de son expression à la surface des cellules déclenche l'activité des Lymphocytes NK (natural killer) qui détruisent la cellule. Ceci permet d'éliminer les cellules tumorales ou infectées qui échappent au système immunitaire "classique" en diminuant l'expression du CMH I (figure.1).

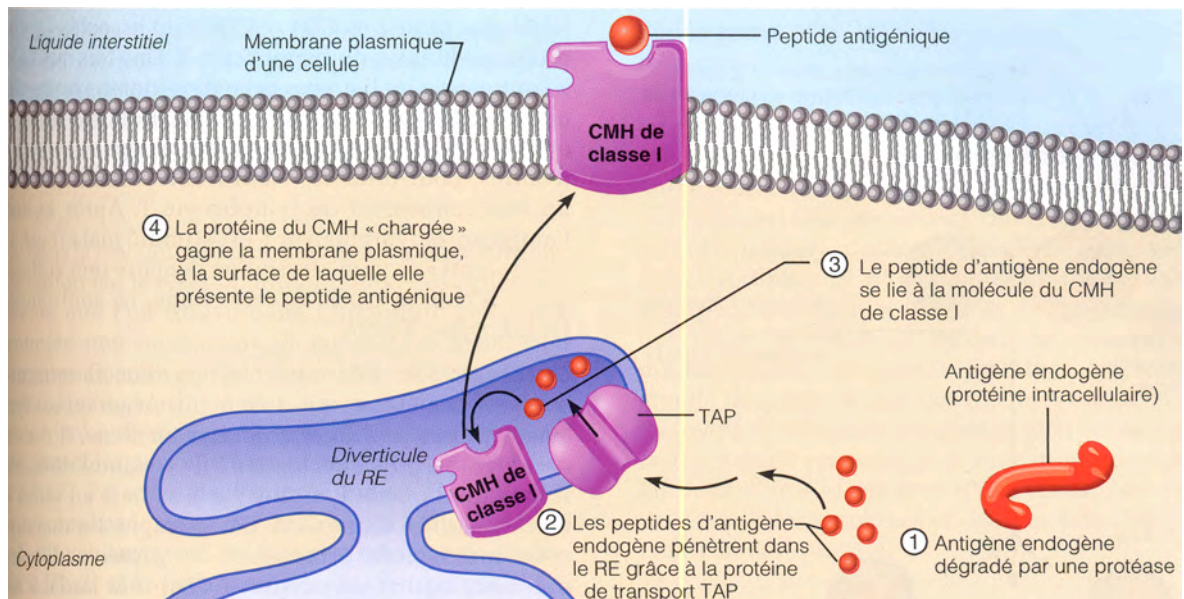


Figure.1 : Mécanisme de présentation d'antigène par le CMH I.

CMH II

Le CMH II est une molécule retrouvée à la surface des cellules immunologiques telles que les lymphocytes, les macrophages,... Le CMH de classe II est composé d'une chaîne alpha, d'une chaîne bêta et d'une cavité à peptide (figure.2)

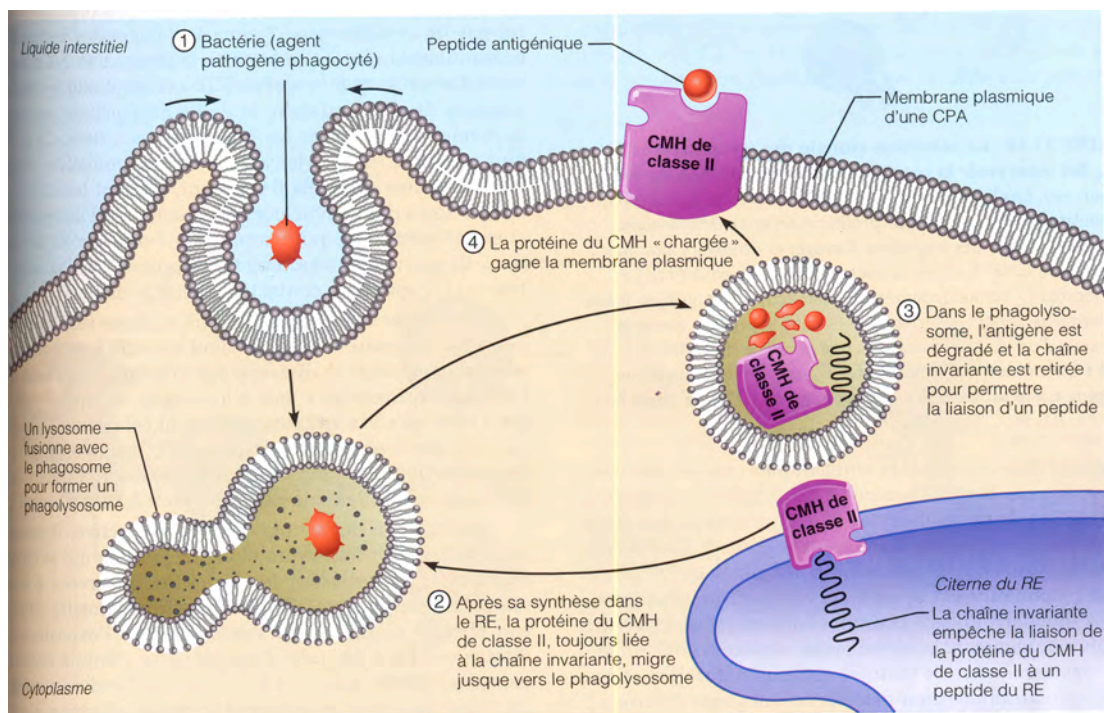


Figure.2 : Mécanisme de présentation d'antigène par le CMH II

14-Anergie :

Dysfonctionnement du système immunitaire caractérisé par la perte de sa capacité à réagir au contact d'un antigène particulier. C'est une inactivation fonctionnelle des lymphocytes T qui survient lorsque ces cellules reconnaissent des antigènes sans les niveaux adéquats de molécules de costimulation (seconds signaux) nécessaires à une activation complète des lymphocytes T. On observe également une anergie dans le cas où un

lymphocyte B immature reconnaît par son BCR un antigène du soi soluble. Seule l'interleukine 6 (IL6) peut reverser l'anergie des lymphocytes T et les activer.

15-Sélection positive des lymphocytes T :

Les thymocytes doubles positifs migrent dans le cortex thymique, où ils sont mis en contact avec des auto-antigènes peptidiques présentés dans les molécules du CMH des cellules épithéliales du cortex thymique. Seuls les thymocytes qui sont capables de se lier à un complexe CMH/peptide avec suffisamment d'affinité reçoivent un signal de survie. Les autres vont mourir par apoptose et leur débris seront éliminés par des macrophages. Ce phénomène est appelé « sélection positive » car les cellules survivantes sont celles qui ont lié une interaction. Selon la nature du CMH que leur TCR a pu lier, les thymocytes doubles positifs perdent l'un des deux marqueurs. Les cellules dont le TCR peut lier des molécules du CMH de classe I gardent le CD8 et perdent le CD4; ceux qui lient une molécule de classe II perdent le CD8 et gardent le CD4 (figure.3)

16-Sélection négative des lymphocytes T :

Les cellules ayant survécu à la sélection positive vont migrer dans la moelle thymique (medula). Une fois dans la modula, les thymocytes sont mis à nouveau en présence de peptides issus du soi, complexés avec les molécules du CMH portées par des cellules épithéliales. Cette fois, ce sont les cellules dont le TCR interagit fortement avec les antigènes qui vont mourir par apoptose secondaire à une hyperactivation. Comme cette fois ce sont les cellules qui ne lient pas d'interaction qui survivent, on parle de sélection négative. C'est ce phénomène qui permet l'élimination précoce de lymphocytes auto-réactifs qui sont la cause de maladies auto-immunes. Au moment où les lymphocytes naïfs quittent le thymus, ils sont incapables de réagir à la présence de "leur" peptide (figure.3)

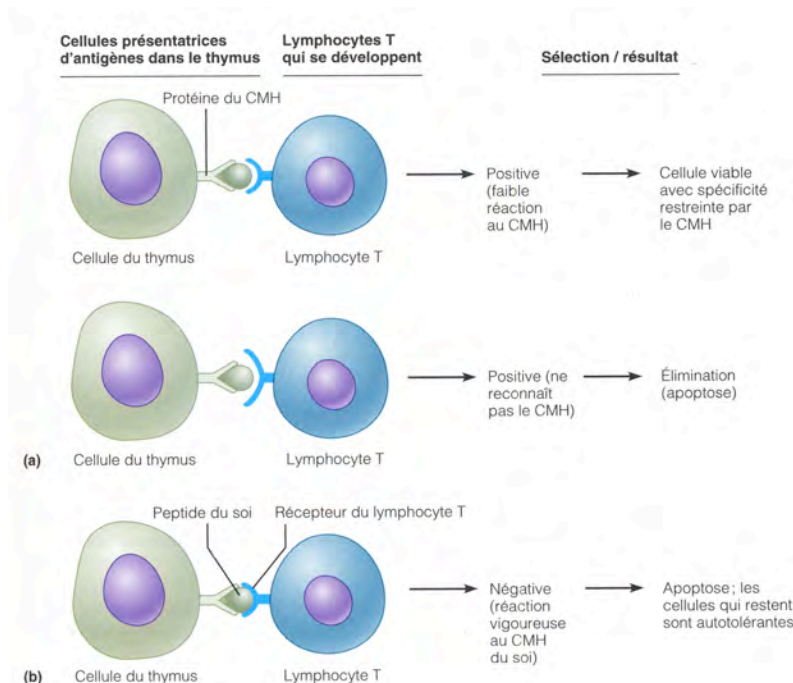


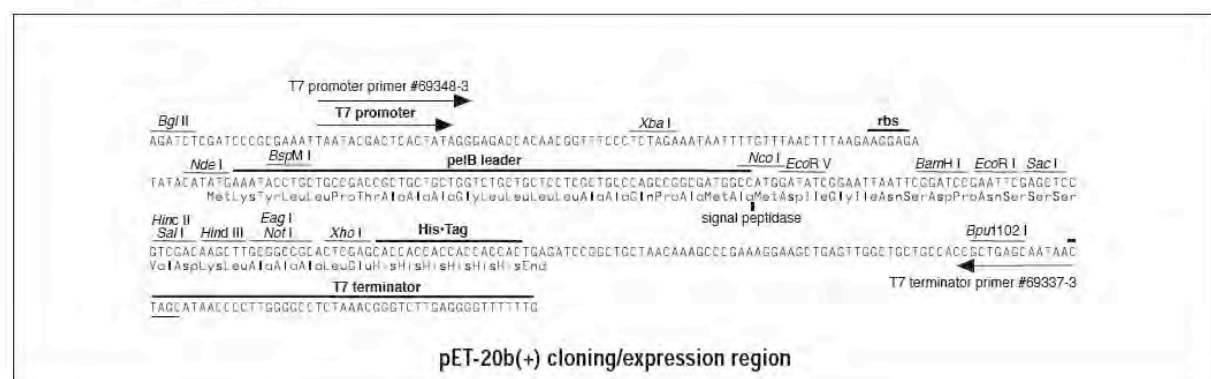
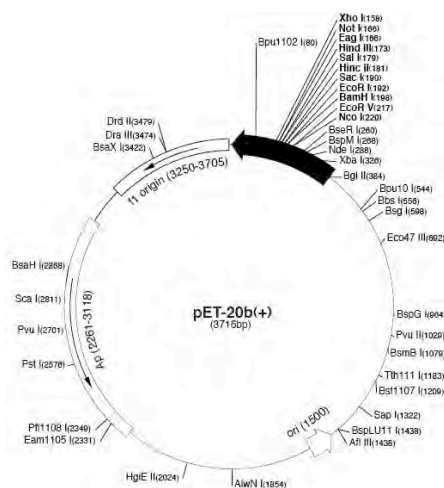
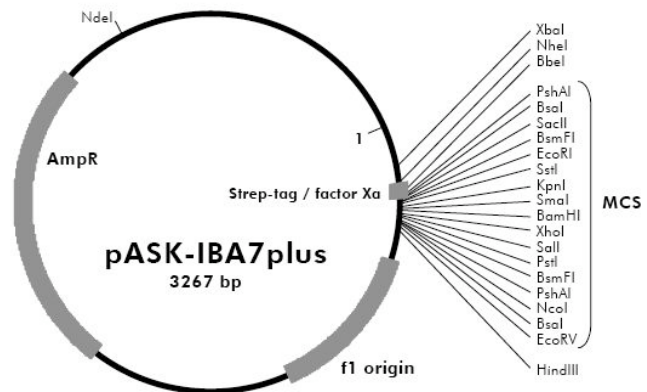
Figure.3 : Schéma de la sélection de Lymphocyte T positive (a) et négative (b).

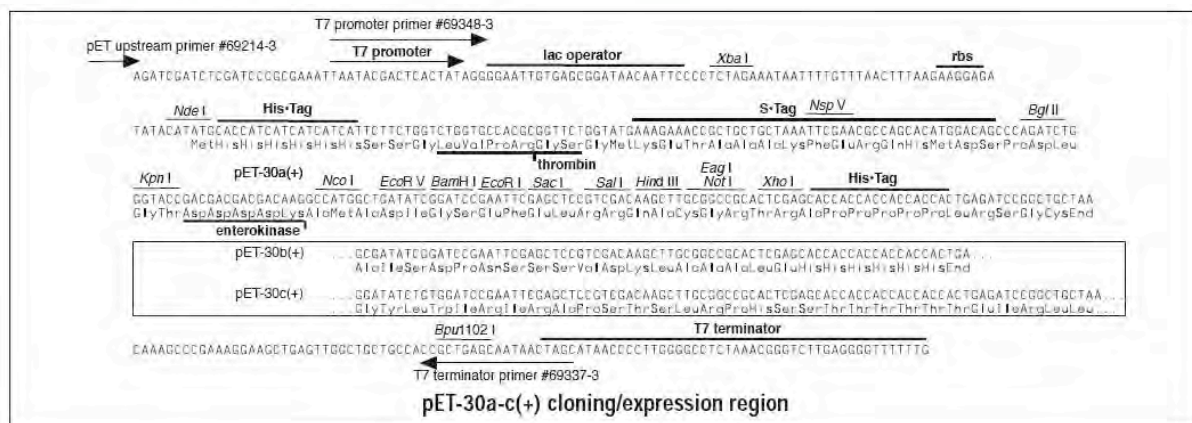
17-TCR :

Le récepteur des cellules T ou TCR (de l'anglais T Cell receptor) est un complexe moléculaire qui se trouve sur la membrane des lymphocytes T (ou cellules T). Ce récepteur

18- Les plasmides:

	from bp	to bp
promoter	37	72
forward primer binding site	57	76
Strep-tag	160	192
factor Xa cleavage site	193	204
multiple cloning site	205	281
reverse primer binding site	349	365
f1 origin	378	816
Amp ^R resistance gene	965	1825
Tet-repressor	1835	2458





Séquence d'acides aminés:

```
1      SISQEQSRQD AIYQNLTQLK AAVGELSEKS KLQEIQELT QLKAAVGELP EKSKLQEIQ 60
61     ELTRLKAAVG ELPEKSKLQE IYQELTWLKA AVGELPEKSK MQEIQELTR LKAAVGELPE 120
121    KSKQQEIQE LTRLKAAVGE LPEKSKQEI YQELTRLKAA VGELPEKSKQ QEIQELTQL 180
181    KAAVERLCHP CPWEWTFQG NCYFMSNSQR NWHDSITACK EVGAQLVVIK SAEEQNFLQL 240
241    QSSRSNRFTW MGLSDLNQEG TWQWVDGSPL LPSFKQYWNR GEPNNVGEED CAEFSGNGWN 300
301    DDKCNLAKFW ICKKSAASCS RDEEQFLSPA PATPNPPPA
339
```

séquence d'acide nucléique (1017 bp):

```
tcc ata agt cag gaa caa tcc agg caa gac gcg atc tac cag aac ctg acc cag ctt
aaa gct gca gtg ggt gag ctc tca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag
ctg acc cag ctg aag gct gca gtg ggt gag ctt cca gag aaa tct aag ctg cag gag
atc tac cag gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ctt cca gag aaa tct
aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc tgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ctt
cca gag aaa tct aag atg cag gag atc tac cag gag ctg act cgg ctg aag gct gca
gtg ggt gag ctt cca gag aaa tct aag cag cag gag atc tac cag gag ctg acc cgg
ctg aag gct gca gtg ggt gag ctt cca gag aaa tct aag cag cag gag atc tac cag
gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ctt cca gag aaa tct aag cag cag
gag atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag gct gca gtg gaa cgc ctg tgc cac ccc
tgt ccc tgg gaa tgg aca ttc ttc caa gga aac tgt tac ttc atg tct aac tcc cag
cgg aac tgg cac gac tcc atc acc gcc tgc aaa gaa gtg ggg gcc cag ctc gtc gta
atc aaa agt gct gag gag cag aac ttc cta cag ctg cag tct tcc aga agt aac cgc
ttc acc tgg atg gga ctt tca gat cta aat cag gaa ggc acg tgg caa tgg gtg gac
ggc tca cct ctg ttg ccc agc ttc aag cag tat tgg aac aga gga gag ccc aac aac
gtt ggg gag gaa gac tgc gcg gaa ttt agt ggc aat ggc tgg aac gac gac aaa tgt
aat ctt gcc aaa ttc tgg atc tgc aaa aag tcc gca gcc tcc tgc tcc agg gat gaa
gaa cag ttt ctt tct cca gcc cct gcc acc cca aac ccc cct cct gcg
```

b)DC SIGN_CRD (254-404)

Nombre d'acides aminés: 152

Poids moléculaire: 17361.2

PI théorique: 4.85

	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
Ext. coefficient	51935	53581	53990	54130	53160
Abs 0.1% (=1 g/l)	2.991	3.086	3.110	3.118	3.062

	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
Ext. coefficient	51500	53200	53630	53770	52800
Abs 0.1% (=1 g/l)	2.966	3.064	3.089	3.097	3.041

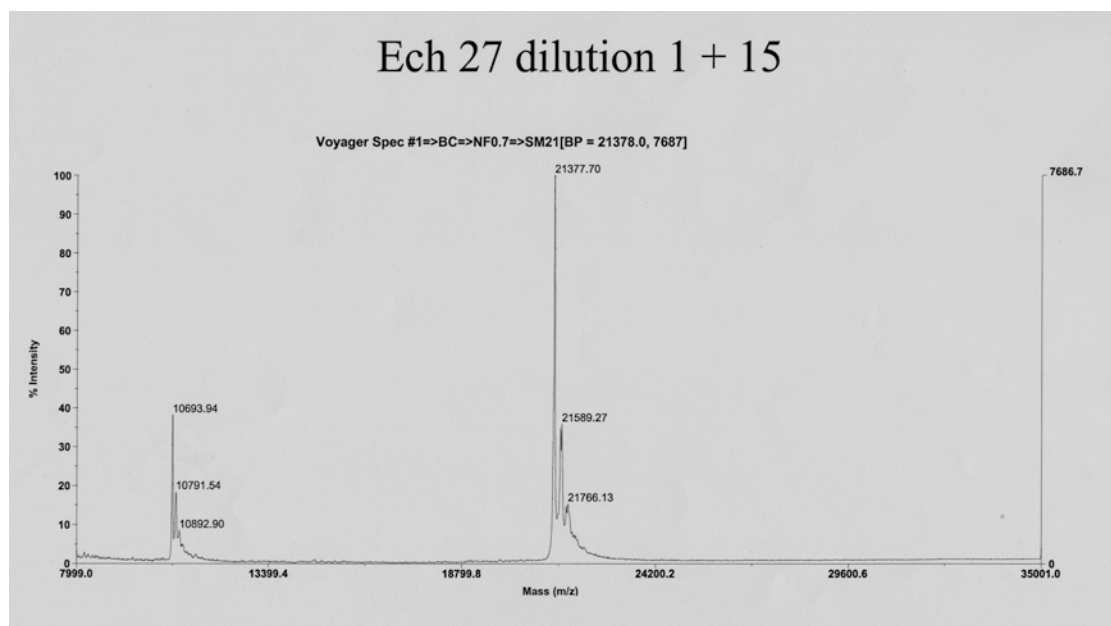
Séquence d'acides aminés:

```
MHPCPWEWTFQGNQCYFMSNSQRNWHDSITACKEVGAQLVVIKSAEEQNFLQLQSS
RSNRFTWMGLSDLNQEGTWQWVDGSPLPSFKQYWNRGEPNNVGEEDCAEFSGNG
WNDDKCNLAKFWICKKSAASCSRDEEQFLSPAPATPNPPPA
```

Séquence d'acides nucléiques (453 bp):

cac ccc tgt ccc tgg gaa tgg aca ttc ttc caa gga aac tgt tac ttc atg tct aac
tcc cag cgg aac tgg cac gac tcc atc acc gcc tgc aaa gaa gtg ggg gcc cag ctc
gtc gta atc aaa agt gct gag gag cag aac ttc cta cag ctg cag tct tcc aga agt
aac cgc ttc acc tgg atg gga ctt tca gat cta aat cag gaa ggc acg tgg caa tgg
gtg gac ggc tca cct ctg ttg ccc agc ttc aag cag tat tgg aac aga gga gagccc
aac aac gtt ggg gag gaa gac tgc gcg gaa ttt agt ggc aat ggc tgg aac gac gac
aaa tgt aat ctt gcc aaa ttc tgg atc tgc aaa aag tcc gca gcc tcc tgc tcc agg
gat gaa gaa cag ttt ctt tct cca gcc cct gcc acc cca aac ccc cct cct gcg

20-Analyse par Spectrométrie de masse de l'échantillon DC-SIGN Neck:



Ce spectre est identiquement obtenu pour les 2 fractions correspondantes aux deux états oligomériques de DC-SIGN Neck: on observe 2 pics, le premier à 21377 (qui reste dans la marge d'erreur de la mesure et qui a une variation par rapport à la vraie masse moléculaire inférieure à celle d'un acide aminé perdu) et qui correspond à la masse de DC-SIGN Neck. Le pic deuxième à 10693 et qui correspond à la moitié du premier en termes de masse puisqu'il s'agit de la protéine doublement chargée. L'absence d'autres pics bien démarquée, à part celle de l'acide sinapinique, indique une absence de dégradation.

21-Analyse par séquençage N-terminale de DC-SIGN Neck:

L'analyse par séquençage N-terminale de la protéine DC-SIGN Neck est réalisée sur un échantillon ayant été placé à 4°C pendant 3 semaines après les analyses par spectrométrie de masses et présente une dégradation de l'ordre de 14%.



Grenoble 13th/Aug/2007

To: Georges TABARANI
IBS/LPM

From: Gérard J. Arlaud and Jean-Pierre Andrieu
Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire

**Results of the N-terminal protein sequence analysis
of sample:**

DC SIGN NECK MUT 27

Sequence run #4792C

position 11 instead of M. Protein Sequence Determination

Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 (s/n: 9510287J). Phenylthiohydantoin amino acid derivatives generated at each sequencing cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems Model 610A (software version 2.1). The PTH-amino acid standard kit (Perkin-Elmer P/N 0505046) was used and reconstituted according to the manufacturer's instructions (900776 Rev D). The procedures and reagents used were as recommended by the manufacturer. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequencing cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids.

Sequence run #4792C

Two sequences were found:

S I S Q E Q S R

in accordance with the sequence of N-terminal of DC-SIGN neck mut, from the first residue (~86%), and

X X L K A A V G

in accordance with the sequence of DC-SIGN neck mut, from the residue 63 (~14%).

Sequence determination analyses were performed by J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/UJF, Grenoble, France).

Jean-Pierre ANDRIEU

